



**Carla Maria Dias  
Marques de Oliveira**

**Resistência de vinhos à oxidação**



**Carla Maria Dias  
Marques de Oliveira**

## **Resistência de vinhos à oxidação**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química de Produtos Naturais, realizada sob a orientação científica do Doutor Artur Silva, professor catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e com a co-orientação da Doutora Paula Guedes de Pinho e do Doutor António César Ferreira, professores contratados da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa do Porto.

Dedico este trabalho à minha família pelo incansável apoio.

## **o júri**

### **Presidente**

Doutor José Abrunheiro da Silva Cavaleiro, Professor Catedrático da Universidade de Aveiro.

### **Vogais**

Doutor Artur Manuel Soares da Silva, Professor Catedrático da Universidade de Aveiro.  
(Orientador)

Doutor Luís Herculano Melo de Carvalho, Professor Associado com Agregação da Universidade de Trás-Os-Montes e Alto Douro.

Doutor António César da Silva Ferreira, Investigador Auxiliar da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa. (Co-Orientador)

## **agradecimentos**

Ao Professor Doutor Artur Silva, orientador desta dissertação, o meu sincero reconhecimento pelos ensinamentos e incentivos que me transmitiu. Agradeço ainda a disponibilidade dispensada ao longo de todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Doutora Paula Guedes e ao Doutor António César Ferreira, co-orientadores desta dissertação, o meu sincero agradecimento pelos ensinamentos, incentivos e pela amizade demonstrada ao longo deste trabalho.

À Universidade de Aveiro e ao seu Departamento de Química pela disponibilização dos meios necessários à execução experimental deste trabalho.

Ao Lic. Hilário Tavares pelo contributo prestado na obtenção dos espectros de RMN.

Um agradecimento especial aos meus amigos e colegas de Mestrado, em particular à Nathalie, à Antonina, à Marisa, à Adelaide, ao Domingos e ao Miguel pelo companheirismo, prontidão e amizade demonstrada ao longo desta dissertação.

Aos meus pais, irmãos e namorado. Obrigada pela vossa presença constante, pela vossa preocupação e pelo vosso apoio.

Um agradecimento especial à minha irmã Alda, pelo apoio em todos os momentos.

Ao iBeSa, Instituto de Bebidas e Saúde, pela atribuição de uma bolsa N° P11-04 que apoiou a realização deste trabalho.

## palavras-chave

vinho, oxidação, radicais livres, actividade antioxidante.

## resumo

Durante os últimos anos um vasto número de trabalhos têm vindo a divulgar o valor nutricional dos compostos antioxidantes. Sendo o vinho uma fonte rica em antioxidantes, muitos destes trabalhos foram realizados nesta matriz, onde a concentração destes antioxidantes está relacionada com o teor em radicais livres no organismo humano (principal causa do envelhecimento). Porém, os vinhos são sistemas dinâmicos que mudam continuamente a sua composição em função da exposição à temperatura, oxigénio, luz, etc. Neste trabalho pretendeu-se realçar o valor de algumas moléculas ditas com poder antioxidante na protecção à oxidação do próprio vinho, sobretudo nos vinhos brancos cujo problema tem um impacto económico, não negligenciável, no sector vitícola. É objectivo deste trabalho conseguir relacionar a presença de alguns destes compostos com a resistência à oxidação do vinho. Para isso, foi desenvolvida uma técnica de fraccionamento prévio do vinho por extracção líquido-líquido sendo a actividade antioxidante de cada fracção avaliada através da aplicação de dois métodos utilizando radicais livres. Foram analisados vinhos brancos de diferentes idades nomeadamente de envelhecimento normal e de envelhecimento forçado onde, neste último conjunto de vinhos, se tentou avaliar simultaneamente o impacto de certos parâmetros (temperatura, oxigénio e dióxido de enxofre) na actividade antioxidante dos mesmos. Para além de vinhos brancos foram igualmente analisados vinhos do Porto tintos de diferentes idades (2 e 10 anos). Algumas das fracções que revelaram maior poder antioxidante foram sujeitas a análise espectral por RMN a fim de tentar caracterizar as famílias de compostos nelas envolvidas e conhecer a natureza dos mecanismos e das espécies envolvidas na protecção ao oxigénio: A resistência à oxidação. Para uma eficaz interpretação dos resultados foi dada a conhecer, na secção da Introdução, a composição do vinho bem como as concentrações dos compostos normalmente encontradas nesta matriz e identificaram-se famílias de compostos com reconhecida actividade antioxidante como é o caso dos compostos polifenólicos.

**keywords**

Wine, oxidation, free radicals, antioxidant activity.

**abstract**

During the past few years, an important number of works have revealed the nutritional value of antioxidants. Much effort has been focused on wines because they constitute a very rich source of antioxidants, where their concentration is related with the levels of free radicals in the human body. Wines are dynamic systems that change continuously in response to exposure to temperature, oxygen, light, etc. In the present work the value of some recognized molecules as antioxidants in the protection of wine oxidation is distinguished, given special care to white wine, where this problem has a great economic impact in the wine sector. The aim of this study is to achieve a relationship between the presence of some antioxidants with the resistance to wine oxidation. For this reason, a previous fraction technique of wine by a liquid-liquid extraction was developed and the antioxidant capacity of each fraction was evaluate by two free radical methods. White wines of normal and forced aged have been analysed. In the forced aged wines an attempt to evaluate the impact of some parameters, namely, temperature, oxygen and sulphur dioxide, in their antioxidant activity was made. Besides white wines, Port wines were also analysed (two and ten years old). RMN analysis was performed in the highest antioxidant capacity fractions in order to attempt the characterization of the involved species in oxygen protection: the resistance to oxidation. In order to afford an efficient interpretation of the results, the introduction of this work provides a report of the wine composition, as well as the range of compound concentrations usually found in wine, and a description of recognised families with antioxidant activity like phenolic compounds.

## ***Índice Geral***

***Índice Geral***-----

***-i***

***Abreviaturas e símbolos***-----

***-ii***

***Capítulo 1 – Introdução***-----

***2***

***Capítulo 2 – Parte Experimental***-----

***46***

***Capítulo 3 – Resultados e Discussão***-----

***--63***

***Capítulo 4 – Conclusão***-----

***107***

***Capítulo 5 – Bibliografia***-----

***110***

***Capítulo 6 – Anexos***-----

***127***



## ***Abreviaturas e símbolos***

$^{13}\text{C}$  – carbono 13

$^1\text{H}$  – próton

$^1\text{J}(\text{CH})$  – constante de acoplamento entre prótons e carbonos que distam de 1 ligação

$^2\text{J}(\text{CH})$  - constante de acoplamento entre prótons e carbonos que distam de 2 ligações

$^3\text{J}(\text{CH})$  - constante de acoplamento entre prótons e carbonos que distam de 3 ligações

AA – ácido ascórbico

AAR – actividade anti-radicalar

ABTS – ácido 6-[2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolinil)] sulfónico

$\text{ABTS}^{\bullet+}$  – catião-radical do ácido 6-[2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolinil)] sulfónico

AG – ácido gálico

Cat – catequina

COSY – espectro de RMN de correlação espectroscópica homonuclear, bidimensional

DPPH – 2,2 – difenil-1-picril-hidrazina

$\text{DPPH}^{\bullet}$  – radical 2,2 – difenil-1-picril-hidrazilo

HMBC – espectro de RMN de correlação espectroscópica heteronuclear, bidimensional, a longa distância (detecção inversa)

HSQC – espectro de RMN de correlação espectroscópica heteronuclear, bidimensional (detecção inversa)

L.D.D – limite de detecção

L.D.Q – limite de quantificação

RMN – ressonância magnética nuclear

BHA – 2-*terc*-butil-4-metoxifenol

BHT – 2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol

ESR – espectroscopia de ressonância de spin electrónico

EPR – espectroscopia de ressonância paramagnética de electrão

## Capítulo 1 – Introdução

1 – Introdução .....	2
1.1 – A composição do vinho.....	3
1.1.1 - Famílias de compostos existentes no vinho.....	3
1.1.2 – Famílias de compostos com reconhecida actividade antioxidante .....	23
1.1.2.1 - <i>Compostos fenólicos</i> .....	23
1.1.2.2 - <i>Carotenóides</i> .....	24
1.1.2.3 - <i>Produtos da reacção de Maillard</i> .....	24
1.2 – Processos de separação utilizados na extracção de antioxidantes naturais.....	27
1.3 – Metodologias utilizadas para avaliar a actividade antioxidante.....	30
1.3.1 – Métodos baseados na peroxidação lipídica .....	31
1.3.2 – Métodos baseados na captura de radicais livres .....	32
1.3.2.1 – <i>Captura do radical hidroxilo (<math>HO^{\bullet}</math>)</i> .....	32
1.3.2.2 – <i>Captura do radical peroxilo (<math>ROO^{\bullet}</math>)</i> .....	33
1.3.2.3 – <i>Método do ABTS para estimar a actividade antiradicalar</i> .....	34
1.3.2.4 – <i>Método do DPPH para estimar a actividade antiradicalar</i> .....	38
1.3.2.5 – <i>ESR e sensores de fluorescência</i> .....	42
1.3.3 – Índice de Folin-Ciocalteu – compostos fenólicos totais .....	43
1.3.4 – Métodos electroquímicos .....	43
1.4 - Aplicações de técnicas de RMN em vinhos.....	46

## 1 – Introdução

Durante os últimos anos um vasto número de trabalhos tem vindo a divulgar o valor nutricional dos compostos polifenólicos como antioxidantes. Sendo o vinho uma fonte rica em polifenóis, com características antioxidantes e simultaneamente com actividade biológica, muitos destes trabalhos foram realizados nesta matriz. Porém, os vinhos são sistemas dinâmicos que mudam continuamente a sua composição em função da exposição à temperatura, oxigénio, luz, etc. Como consequência, a oxidação dos compostos polifenólicos, bem como de outros compostos existentes no vinho, está directamente relacionada com a actividade antioxidante que pode mudar durante o envelhecimento e condições de armazenamento do vinho.

Neste trabalho pretendeu-se conhecer a natureza das espécies envolvidas na resistência à oxidação. Para isso, desenvolveu-se uma técnica de fraccionamento prévio do vinho, para separação e extracção dos compostos nele existentes, tendo sido aplicadas metodologias para avaliar a actividade antioxidante de cada fracção. O impacto de certos parâmetros (temperatura, oxigénio e SO<sub>2</sub>) na actividade antioxidante foi igualmente avaliado simulando o envelhecimento e condições de armazenamento do vinho.

Para uma eficaz interpretação dos resultados é necessário conhecer a composição do vinho bem como as concentrações dos compostos normalmente encontradas nesta matriz. É igualmente necessário identificar famílias de compostos com reconhecida actividade antioxidante como é o caso dos compostos polifenólicos. Estes temas serão abordados no ponto 1.1 da Introdução – A composição do vinho.

## 1.1 – A composição do vinho

### 1.1.1 - Famílias de compostos existentes no vinho

**Hidratos de carbono** – Dos açúcares existentes no vinho as hexoses mais importantes são a glucose e a frutose (**Figura 1**), enquanto que as pentoses com maior abundância são a arabinose e a xilose (**Figura 2**) (Handbook of Enology, 2000). Nos vinhos secos existe sempre uma quantidade de açúcar residual que não é metabolizado, cerca de 1 a 2 g/L de açúcar residual.

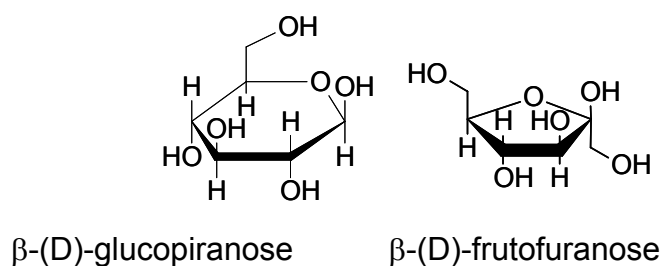


Figura 1 – Representação das projecções de Haworth da glucose e da frutose.

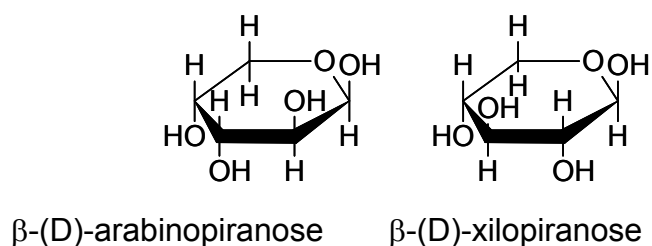


Figura 2 – Representação das projecções de Haworth da arabinose e da xilose.

**Álcoois** – Logo a seguir à água que representa 85 % a 90 % do volume do vinho, o etanol (C<sub>2</sub>) é o constituinte mais abundante sendo o suporte do aroma e do “bouquet” do vinho. A concentração de etanol varia em função do tipo de vinho. Assim, para vinhos da região dos Vinhos Verdes a concentração em etanol varia entre 9 % a 10 %, enquanto que um vinho do Porto tem cerca de 20 % de etanol. Os vinhos brancos têm normalmente menos quantidade de etanol (10 % a 12 %) que os vinho tintos (12 % a 14 %). O glicerol (C<sub>3</sub>) é, logo a seguir ao etanol, o álcool existente em maior quantidade com concentrações que podem variar entre 5 a 20 g/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1972). O 2,3-butanodiol (C<sub>4</sub>) existe em quantidades que podem variar entre 0,3 a 1,35 g/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1972). Na **Tabela 1** estão representados os álcoois mais importantes encontrados no vinho. Os álcoois com mais de 2 átomos de carbono são denominados de álcoois superiores. A maior parte destes álcoois são produzidos durante a fermentação alcoólica. Há um limite máximo para as suas concentrações uma vez que alguns destes álcoois podem ser tóxicos para o organismo. Na **Tabela 2** estão representados os álcoois mais importantes bem como as concentrações normalmente encontradas no vinho.

Fórmula	Nome	Nº Carbonos
CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -OH	Etanol	C <sub>2</sub>
CH <sub>2</sub> OH-CHOH-CH <sub>2</sub> OH	Glicerol	C <sub>3</sub>
CH <sub>3</sub> -CHOH-CHOH-CH <sub>3</sub>	2,3-Butanodiol	C <sub>4</sub>
CH <sub>2</sub> OH-(CHOH) <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> OH	Eritritol	C <sub>4</sub>
CH <sub>2</sub> OH-(CHOH) <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> OH	Arabitól	C <sub>5</sub>
CH <sub>2</sub> OH-(CHOH) <sub>4</sub> -CH <sub>2</sub> OH	Manitol	C <sub>6</sub>
CH <sub>2</sub> OH-(CHOH) <sub>4</sub> -CH <sub>2</sub> OH	Sorbitol	C <sub>6</sub>
(CHOH) <sub>6</sub>	Meso-inositol	C <sub>6</sub>

Tabela 1 – Álcoois e polióis mais importantes encontrados no vinho (Handbook of Enology, 2000).

Fórmula	Álcoois	Concentração no vinho
$\text{H-CH}_2\text{OH}$	Metanol *	8 - 269 mg/L
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$	1-Propanol	5 - 125 mg/L
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$	1-Butanol	0,003 - 8,5 mg/L
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3\text{-CH-CH}_2\text{OH} \end{array}$	2-Metil-propan-1-ol	9 - 174 mg/L
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH-CH}_2\text{OH} \end{array}$	2-Metil-butan-1-ol **	87 - 564 mg/L
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3\text{-CH-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH} \end{array}$	3-Metil-butan-1-ol **	87 - 564 mg/L
$\Phi\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{OH}$	2-Fenil-etanol	4 - 197 mg/L
$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-CH}_2\text{OH}$	Hexanol	0,3 - 12 mg/L

Tabela 2 – Álcoois com mais do que 2 átomos de carbono (álcoois superiores) mais importantes encontrados no vinho (Handbook of Enology, 2000).

\* - Não é considerado álcool superior.

\*\* - Ao conjunto destes dois álcoois superiores chama-se álcoois amílicos.

**Polióis** – Os polióis são álcoois poli-hidroxilados provenientes das aldoses: eritritol ( $\text{C}_4$ ) 30-200 mg/L; arabitol ( $\text{C}_5$ ) 25-350 mg/L; manitol ( $\text{C}_6$ ) 90-750 mg/L; sorbitol ( $\text{C}_6$ ) 30-300 mg/L; meso-inositol ( $\text{C}_6$ ) 220-730 mg/L (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1972). Na **Tabela 1** estão representadas as fórmulas de estrutura dos polióis mais importantes encontrados no vinho.

**Ácidos orgânicos** – Os ácidos orgânicos existem sob duas formas no vinho: forma livre, correspondendo à acidez total e à maior parte dos ácidos orgânicos, e outra parte na forma de sais combinados com certos compostos do vinho, determinada pela alcalinidade das cinzas. Na **Tabela 3** e **Figura 3** estão

representados os ácidos orgânicos mais importantes bem como as concentrações normalmente encontradas no vinho. A estes ácidos devemos juntar o ácido ascórbico (**Figura 4**). O ácido ascórbico é um agente redutor mais forte que os fenóis e reduz as correspondentes quinonas a semiquinonas ao pH do vinho. O ácido ascórbico surge naturalmente nas uvas numa concentração que varia entre 10 a 100 mg/L. No entanto, desaparece rapidamente durante o processo de vinificação. Em alguns vinhos brancos pode ocorrer adição de ácido ascórbico (50 a 100 mg/L) como agente antioxidante.

Ácido	Origem	Concentração no vinho
Ácido tartárico	uva	2 - 6 g/L
Ácido málico	uva	1 - 6,5 g/L
Ácido cítrico	uva	0,5 - 1 g/L
Ácido succínico	fermentativa	0,5 - 1 g/L
Ácido láctico	fermentativa	0,2 - 2,5 g/L

Tabela 3 – Ácidos orgânicos mais importantes encontrados no vinho (Handbook of Enology, 2000).

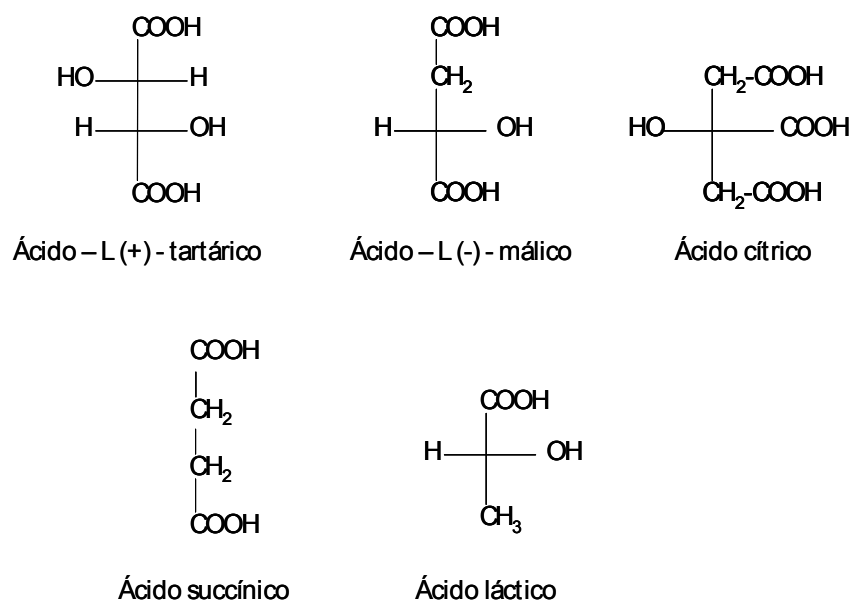


Figura 3 – Estrutura dos ácidos orgânicos mais importantes encontrados no vinho.



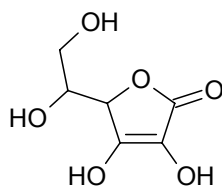


Figura 4 – Estrutura do ácido ascórbico.

**Ácidos orgânicos de cadeia alifática** – O composto mais importante desta série de moléculas é o ácido acético em concentrações que não devem ultrapassar as 0,5 g/L (0,1 a 0,4 g/L). Este composto é um subproduto da fermentação alcoólica pelas leveduras. No entanto, a sua formação também está relacionada com a actividade bacteriana (bactérias lácticas e/ou acéticas). Na **Tabela 4** estão representados os ácidos gordos mais importantes bem como as concentrações normalmente encontradas no vinho.

Fórmula	Nome	Concentração no vinho
H-COOH	Fórmico	0,05 g/L
CH <sub>3</sub> -COOH	Acético	0,5 g/L
CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH	Propiónico (C3)	0,5 - 15 mg/L
CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH	Butanóico (C4) (butírico)	0,5 - 15 mg/L
	Isobutanóico (iC4)	0,05 - 5 mg/L
CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH	Valérico (C5)	0,5 - 15 mg/L
	Isovalérico (iC5)	0,05 - 5 mg/L
CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> -COOH	Hexanóico (C6) (capróico)	0,5 - 15 mg/L
CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -COOH	Octanóico (C8) (caprílico)	0,5 - 15 mg/L
CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> -COOH	Decanóico (C10) (cáprico)	0,5 - 15 mg/L
CH <sub>3</sub> -(CH <sub>2</sub> ) <sub>10</sub> -COOH	Dodecanóico (C12) (laúrico)	0,5 - 15 mg/L

Tabela 4 – Ácidos orgânicos mais importantes encontrados no vinho (Handbook of Enology, 2000).

**Sais de ácidos minerais e ácidos orgânicos** – O vinho contém cerca de 2 a 4 g/L de sais de ácidos minerais e alguns ácidos orgânicos. **Catiões:** O potássio é o catião dominante com concentrações que podem variar de 0,5 a 2 g/L. A concentração de cálcio varia entre 80 a 140 mg/L, enquanto que o sódio apresenta valores entre 10 e 40 mg/L. Uma quantidade de sódio superior pode

indicar adição fraudulenta de sais alcalinos para desacidificar o vinho. O vinho possui mais magnésio (60-150 mg/L) do que sódio e pequenas quantidades de manganês (1-3 mg/L) podem ser encontradas em todos os tipos de vinho (Handbook of Enology, 2000). A concentração média de íons ferro e cobre no vinho é de 2,8 a 16 mg/L e 0,11 a 3,6 mg/L, respectivamente (Ough e Amerine, 1988). Estes íons metálicos têm uma relativa importância para os enólogos dada a sua fonte de instabilizações no vinho. No entanto, estes íons metálicos têm um papel bastante importante na química do vinho. **Aniões:** Os principais aniões minerais existentes no vinho são os fosfatos (vinho branco: 70-500 mg/L; vinho tinto: 150 mg/L a 1 g/L) e os sulfatos (100 a 400 mg/L), embora esta concentração tenda a aumentar com o envelhecimento, devido à oxidação do SO<sub>2</sub>, podendo alcançar concentrações de 2 g/L. Também estão presentes cloretos com concentrações inferiores a 50 mg/L e nitratos em quantidades vestigiais (Handbook of Enology, 2000).

**Ésteres** – Os ésteres são conjuntamente com os álcoois superiores, o etanol e a água os constituintes maioritários do vinho. Os ésteres são formados quando uma função álcool reage com uma função ácido, com eliminação de uma molécula de água. Considerando as suas concentrações no vinho, os ésteres etílicos de ácidos orgânicos são os mais abundantes, seguindo-se os acetatos de álcoois superiores e os ésteres etílicos de ácidos gordos. Na **Tabela 5** estão representados os ésteres mais importantes bem como as concentrações normalmente encontradas no vinho.

Fórmula	Ésteres etílicos de ácidos orgânicos	Concentração no vinho
$\text{CH}_3\text{OOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOCH}_3$	Succinato de dimetilo	0,5 - 30 mg/L
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOCH}_2\text{CH}_3$	Succinato de dietilo	0,5 - 30 mg/L
$\text{HOOC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOCH}_2\text{CH}_3$	Mono-succinato de etilo	0,5 - 30 mg/L
$\text{CH}_3\text{-CHOH-COOCH}_2\text{CH}_3$	Lactato de etilo	0,5 - 400 mg/L
<b>Acetatos de álcoois superiores</b>		
$\text{CH}_3\text{-COOCH}_2\text{CH}_3$	Acetato de etilo	0,15 - 300 mg/L
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3\text{-COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Acetato de isoamilo	0,05 - 5 mg/L
$\text{CH}_3\text{-COOCH}_2(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$	Acetato de hexilo	0,05 - 5 mg/L
$\text{CH}_3\text{-COOCH}_2\text{CH}_2\Phi$	Acetato de feniletilo	0,05 - 18,5 mg/L
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3\text{-COO-CH}_2\text{-CH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{array}$	Acetato de isobutilo	0,05 - 5 mg/L
<b>Ésteres etílicos de ácidos gordos</b>		
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOCH}_2\text{CH}_3$	Butanoato de etilo (C4C2)	0,05 - 5 mg/L
$\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_4\text{-COOCH}_2\text{CH}_3$	Hexanoato de etilo (C6C2)	0,05 - 5 mg/L
$\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_6\text{-COOCH}_2\text{CH}_3$	Octanoato de etilo (C8C2)	0,05 - 5 mg/L
$\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_8\text{-COOCH}_2\text{CH}_3$	Decanoato de etilo (C10C2)	0,05 - 5 mg/L
$\text{CH}_3\text{-(CH}_2)_{10}\text{-COOCH}_2\text{CH}_3$	Dodecanoato de etilo (C12C2)	0,05 - 5 mg/L

Tabela 5 – Ésteres mais importantes encontrados no vinho (Handbook of Enology, 2000).

**Compostos carbonílicos (aldeídos e cetonas)** – Um grande número de aldeídos e cetonas foi já identificado nos vinhos. Na **Tabela 6** estão representados os compostos carbonílicos mais importantes bem como as concentrações normalmente encontradas no vinho. O composto carbonílico que existe em maior quantidade no vinho é o etanal (**Tabela 6**). À excepção do etanal e da 3-hidroxi-2-butanona (acetoína) (**Tabela 6**), a maior parte deste tipo de compostos está presente em quantidades vestigiais. A **Figura 5** representa as estruturas da  $\beta$ -ionona [4-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexenil)-3-buten-2-ona] e da  $\beta$ -damascenona [4-(2,6,6-trimetil-ciclo-hexa-1,3-dienil)-2-buten-4-ona].

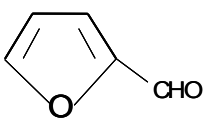
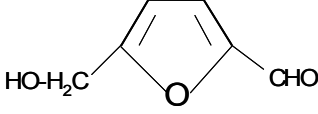
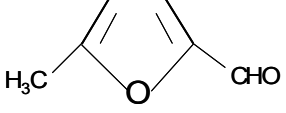
Fórmula	Compostos carbonílicos	Concentração no vinho
$\text{CH}_3\text{-CHO}$	Etanal	7 - 252 mg/L
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3\text{-CH-CH}_2\text{-CHO} \end{array}$	3-Metilbutanal	
$\Phi\text{-CHO}$	Benzaldeído	6 - 500 $\mu\text{g/L}$
$\Phi\text{-CH}_2\text{-CHO}$	Fenilacetaldeído	0,12 mg/L
$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_4\text{-CHO}$	Hexanal	0 - 2 $\mu\text{g/L}$
$\begin{array}{c} \text{CH}_3\text{-CHO-C-CH}_3 \\    \\ \text{O} \end{array}$	Acetoina (3-hidroxi-2-butanona)	0 - 140 mg/L
$\text{CH}_3\text{-CO-CO-CH}_3$	Diacetilo (2,3-butanodiona)	0,2 - 4,1 mg/L
$\text{CH}_3\text{-CO-CO-CH}_2\text{-CH}_3$	2,3-Pentanodiona	10 - 100 $\mu\text{g/L}$
$\text{H-CO-CO-H}$	Glioxal	2 - 4,5 mg/L
$\text{CH}_3\text{-CO-CO-H}$	Metilglioxal	1 - 3 mg/L
	2-Furfural *	0 - 10,3 mg/L
	5-Hidroximetil-2-furfural *	0 - 87 mg/L
	5-Metil-2-furfural **	20 - 400 $\mu\text{g/L}$
ver Fig 5	$\beta$ -Ionona	0 - 30 $\mu\text{g/L}$
ver Fig 5	$\beta$ -Damascenona	5 - 170 $\mu\text{g/L}$

Tabela 6 – Compostos carbonílicos mais importantes encontrados no vinho (Etievant, 1991).

\* e \*\* - Estes compostos têm origem na degradação térmica dos açúcares.

\*\* - (Silva Ferreira, 1998).

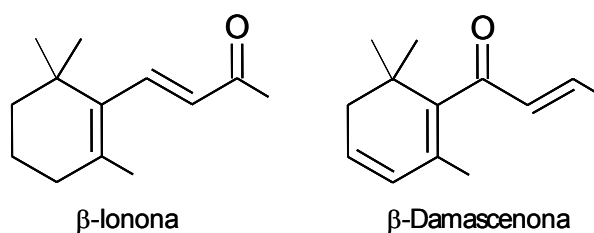


Figura 5 – Estruturas da  $\beta$ -ionona e da  $\beta$ -damascenona.

**Acetais** – Um acetal é formado quando um aldeído reage com um álcool (**Figura 6**). A reacção envolve duas moléculas de álcool e uma molécula de aldeído.

Cerca de vinte compostos deste género já foram reportados na literatura, sendo o mais importante o dietoxietano (**Figura 7**) que resulta da reacção do etanal com o etanol. As reacções de acetaliação são desaceleradas pela presença de SO<sub>2</sub>.

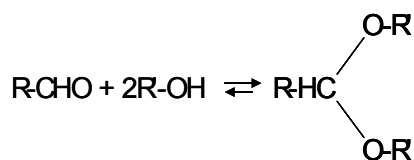


Figura 6 – Formação de um acetal.

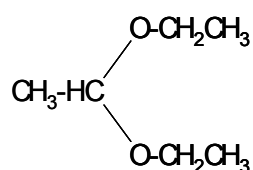


Figura 7 – Estrutura do dietoxietano.

**Lactonas** – as lactonas são formadas por uma esterificação intramolecular entre uma função ácida e uma função álcool. A  $\gamma$ -butirolactona encontra-se no vinho na ordem do miligrama por litro e resulta da esterificação do ácido  $\gamma$ -hidroxibutírico (**Figura 8**). O sotolon (3-hidroxi-4,5-dimetil-2 (5*H*)-furanona) (**Figura 9**) também já foi identificado em vinhos em concentrações na ordem dos 5  $\mu$ g/L e pode resultar da condensação entre o ácido 2-oxobutírico e o etanal (Handbook of Enology, 2000). Finalmente, existem lactonas libertadas pela madeira durante o estágio em barricas como é o exemplo da *cis*- e da *trans*-3-metil- $\gamma$ -octalactona (**Figura 10**).

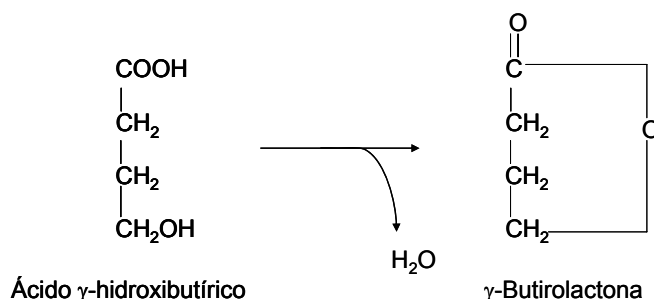


Figura 8 – Formação da  $\gamma$ -butirolactona.

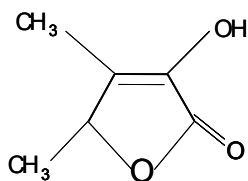


Figura 9 – Estrutura do sotolon.

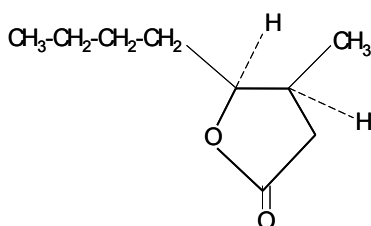


Figura 10 – Estrutura da *cis*-3-metil- $\gamma$ -octalactona.

**Terpenóis** – Os terpenóis pertencem à família química dos álcoois. Estes compostos existem nas uvas na forma livre ou ligados a açúcares. Nos vinhos da casta moscatel ou em vinhos aromáticos têm relevante importância no aroma dos mesmos. Os compostos mais importantes são o linalol, o geraniol, o nerol, o  $\alpha$ -terpeniol e o citronelol (**Figura 11**). Estes compostos podem existir em concentrações na ordem dos 100  $\mu\text{g/L}$  até 1000  $\mu\text{g/L}$  em vinhos muito aromáticos ou de castas em que estes compostos inteiram os aromas varietais como é o caso da casta moscatel.

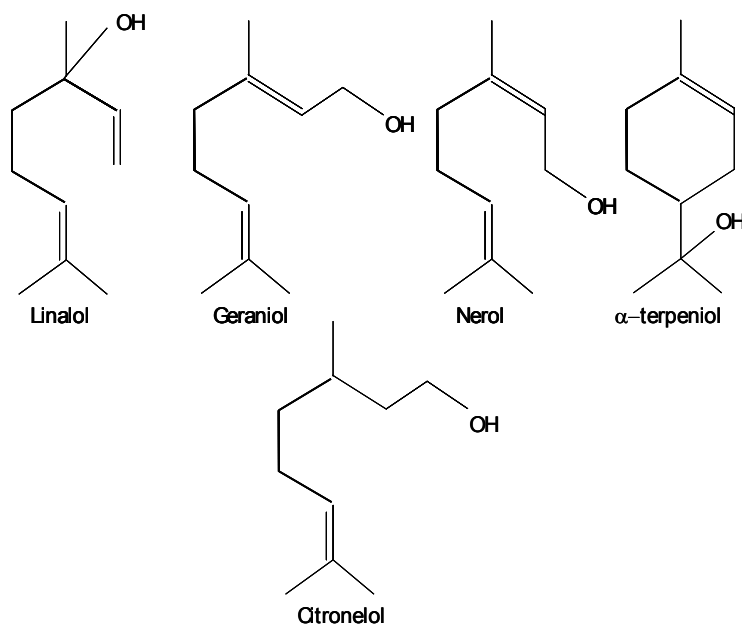


Figura 11 – Terpenóis mais importantes encontrados no vinho.

**Compostos fenólicos** – Existem 4 tipos de compostos fenólicos no vinho: ácidos fenólicos, flavonóides, antocianinas e taninos. As uvas e os vinhos têm ácidos fenólicos, nomeadamente, ácidos benzóicos e cinâmicos (**Figura 12**) em concentrações na ordem de 100 a 200 mg/L em vinho tinto e 10 a 20 mg/L em vinho branco (Handbook of Enology, 2000). Foram identificados 7 ácidos benzóicos: ácido *p*-hidroxibenzóico, ácido protocatéquico, ácido vanílico, ácido gálico, ácido sirínico, ácido salicílico (ácido *orto*-hidroxibenzóico) e ácido gentísico (ácido 2',5'-di-hidroxibenzóico), estes dois últimos em quantidades vestigiais. Em relação aos ácidos cinâmicos foram identificados o ácido *p*-cumárico, o ácido caféico, o ácido ferúlico e o ácido sinápico. Nas uvas e nos vinhos, a maior parte dos ácidos fenólicos encontram-se ligados a açúcares, ácidos orgânicos ou álcoois. As formas livres predominam nos vinhos, principalmente nos vinhos tintos. Numa solução hidroalcoólica, os ácidos fenólicos não apresentam cor mas podem ficar com cor amarela devido à oxidação. Estes compostos são os precursores dos compostos fenólicos voláteis, por acção de certos microrganismos. Os etilfenóis e os etilgaiacóis estão presentes nos vinhos tintos enquanto que no vinho branco predominam os vinilfenóis e os vinilgaiacóis (**Figura 13**). Quando os vinhos são envelhecidos em madeira, por quebra das ligações das lenhinas aquando da sua manufactura, há formação de vários

compostos: gaiacol, metilgaiacol, etilgaiacol, propilgaiacol, alilgaiacol (isoeugenol), siringol e metilsiringol (**Figura 13**). O tirosol (*p*-hidroxifeniletanol, **Figura 14**), que também se inclui neste tipo de compostos, está presente em vinhos tintos e vinhos brancos (20 a 30 mg/L) e é formado durante a fermentação alcoólica. Os estilbenos são outra família mais complexa de compostos fenólicos presentes em uvas e vinhos. Estes compostos têm dois anéis benzênicos geralmente ligados por etano ou etileno. Dentro desta família o *trans*-resveratrol (**Figura 15**) é reconhecido pelas suas características antioxidantes, encontrando-se em vinhos tintos numa concentração que pode variar entre 1 a 3 mg por litro. Dentro da família dos flavonóides encontram-se os compostos derivados do núcleo 2-fenilcromona, flavonas e flavonóis, e os derivados do núcleo 2-fenilcromanona, flavanonas e flavanonóis. Os compostos que existem em maior quantidade no vinho são os flavonóis (campferol, quercetina e mircetina, respectivamente com 1, 2 e 3 grupos hidroxilo no anel lateral, **Figura 16**). Estes compostos têm cor amarela e existem nas películas das uvas tintas e brancas, embora o vinho branco apenas contenha os primeiros dois compostos (campferol e quercetina) (Ribéreau-Gayon *et al.*, 1964). Estas moléculas estão presentes no vinho tinto em concentrações na ordem dos 100 mg/L, enquanto que no vinho branco a sua concentração está compreendida entre 1 a 3 mg/L (Handbook of Enology, 2000). As antocianinas correspondem aos pigmentos vermelhos das uvas tintas e estão presentes nos vinhos tintos em concentrações na ordem de 200 a 500 mg/L. Cinco compostos foram identificadas em uvas e vinhos, cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina (**Figura 17**). Estes compostos são muito mais estáveis na forma glicosilada (antocianinas) do que na forma de aglicona (antocianidinas). Os taninos são assim denominados por fazerem precipitar as proteínas ou outros polímeros derivados de plantas com é o caso dos polissacarídeos. Podem existir na forma de taninos gálicos (hidrolisáveis) ou taninos condensados, polímeros de catequina (**Figura 18**) e epicatequina (**Figura 19**). Os taninos hidrolisáveis incluem os galotaninos e os elagitaninos. Estas moléculas localizam-se nas grânhas e nas películas das uvas. Nos vinhos tintos existem 1-3 g/L de taninos, enquanto que em vinhos brancos existem em concentrações de algumas dezenas de mg /L.



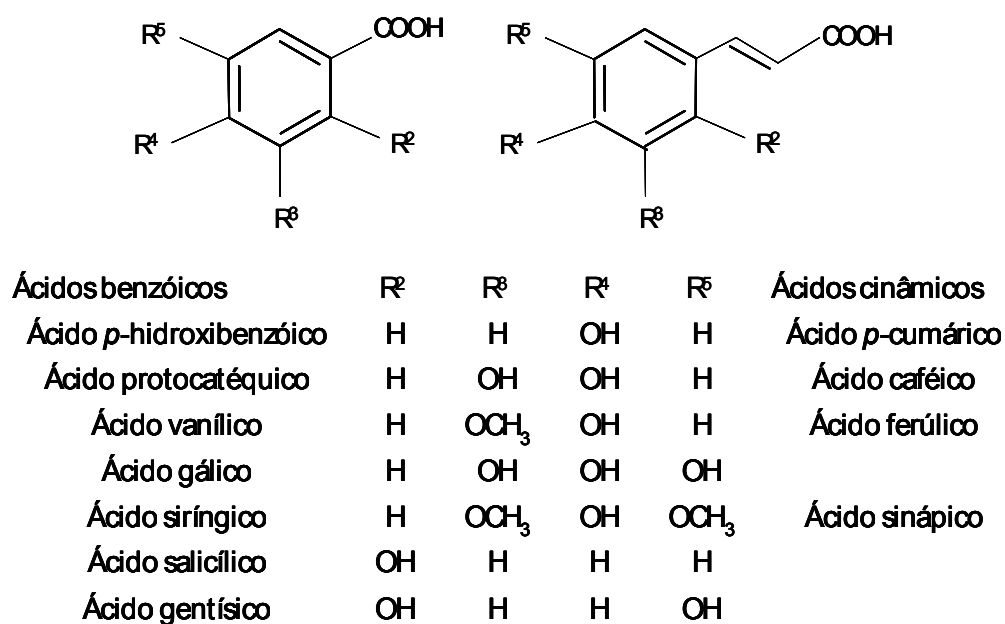


Figura 12 – Ácidos fenólicos encontrados no vinho.

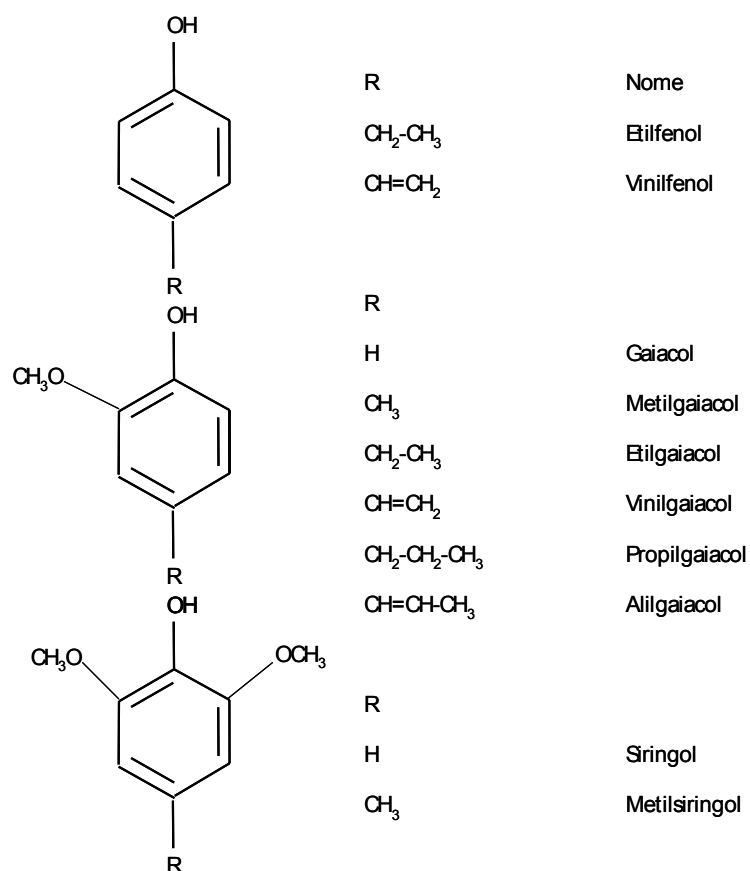


Figura 13 – Compostos fenólicos voláteis encontrados no vinho.

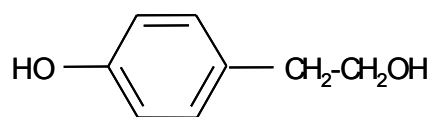


Figura 14 – Estrutura do tirosol (*p*-hidroxifeniletanol).

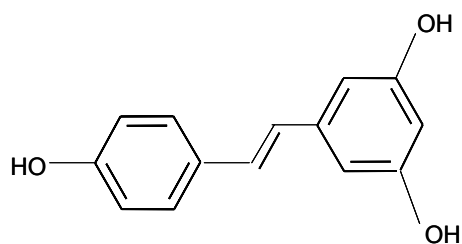
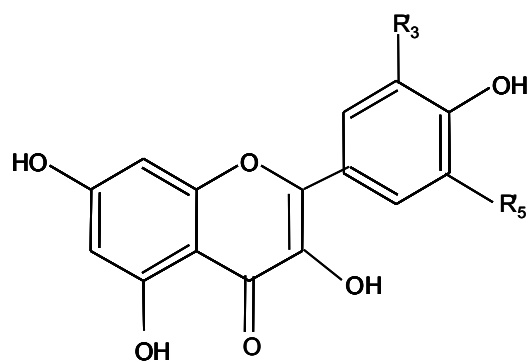
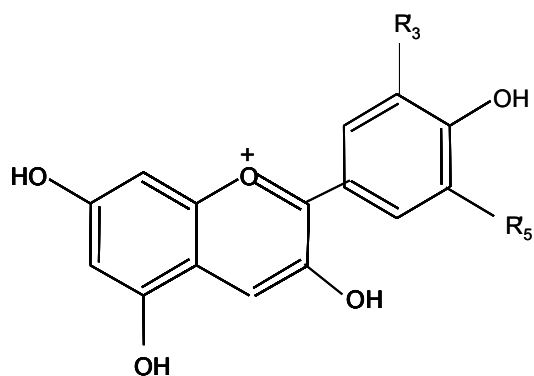


Figura 15 – Estrutura do *trans*-resveratrol.



campferol ( $R'_3=R'_5=H$ ); quercetina ( $R'_3=OH$ ,  $R'_5=H$ ); mircetina ( $R'_3=R'_5=OH$ )

Figura 16 – Estrutura do campferol, quercetina e mircetina.



cianidina ( $R'_3=OH$ ,  $R'_5=H$ ); peonidina ( $R'_3=OCH_3$ ,  $R'_5=H$ ); delphinidina ( $R'_3=R'_5=OH$ );  
 petunidina ( $R'_3=OH$ ,  $R'_5=OCH_3$ ); malvidina ( $R'_3=R'_5=OCH_3$ )

Figura 17 – Principais antocianidinas encontradas no vinho: cianidina, peonidina, delphinidina, petunidina e malvidina.

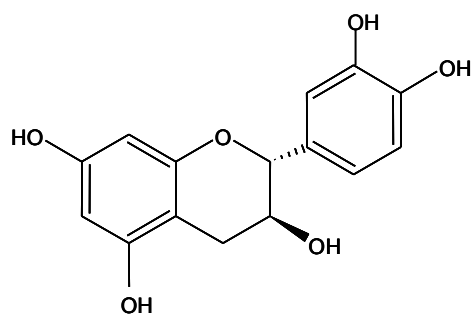


Figura 18 – Estrutura da (+) -catequina.

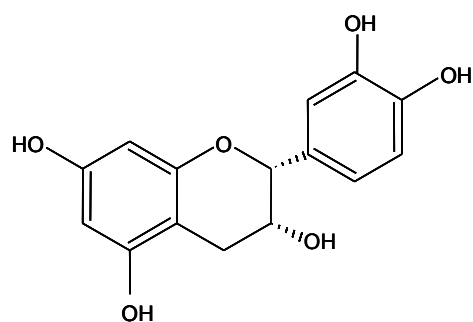


Figura 19 – Estrutura da (-) -epicatequina.

**Compostos com átomos de azoto:** Existem duas formas de azoto nos mostos e vinhos: azoto mineral ou inorgânico e azoto orgânico. O azoto mineral existe na forma de sais de amónio ( $\text{NH}_4^+$ ). Após o envelhecimento do vinho existem algumas dezenas de mg/L de azoto inorgânico. O azoto orgânico está subdividido em 8 famílias: 1 – Aminoácidos; 2 – Oligopeptídeos e polipeptídeos; 3 – Proteínas; 4 – Amidas; 5 – Aminas biogénicas; 6 – Ácidos nucleicos; 7 – Açúcares aminados; 8 – Pirazinas. Os aminoácidos são uma importante fonte de azoto em mostos e vinhos. A concentração total de aminoácidos livres pode variar de 1 a 4 g/L. Os aminoácidos predominantes no vinho são a alanina, a serina, a arginina e a prolina, assim como o ácido glutâmico e a sua forma de amida a glutamina que podem chegar a concentrações da ordem da centena de miligrama por litro. Os aminoácidos mais importantes no vinho estão listados na **Tabela 7**. A glutatona é um importante tripeptídeo. O seu resíduo de cisteína reage parcialmente com quinonas resultantes da oxidação dos fenóis. Os vinhos tintos contêm proteínas livres que precipitam com os taninos. Por outro lado, os vinhos brancos e os rosés podem conter concentrações variadas de proteínas que podem chegar às centenas de mg por litro, provenientes das uvas. A família das amidas está representada por pequenas quantidades de asparagina e glutamina (**Tabela 7**). A ureia e o carbamato de etilo também estão incluídos neste grupo. O vinho contém pequenas quantidades de ureia (menos de 1 mg/L) que pode ser um precursor do carbamato de etilo. Foram reportados valores médios de carbamato de etilo, em vinhos de todos os tipos, de  $7,7 \pm 5,5 \mu\text{g/L}$  (Monteiro *et al.*, 1989). As aminas biogénicas são particularmente controladas devido aos seus efeitos nocivos para a saúde humana (caso da histamina). A origem das aminas biogénicas é bacteriana. Do ponto de vista bioquímico as aminas biogénicas são formadas por descarboxilação dos aminoácidos. Os vinhos contêm geralmente alguns mg/L de aminas biogénicas, embora alguns vinhos excedam as concentrações máximas previstas pela lei (10 mg/L). Existem pequenas quantidades de glucosamina e galactosamina no vinho. As pirazinas são heterociclos de 6 membros com dois

átomos de azoto (**Figura 20**). Estes compostos têm elevado impacto olfactivo e participam no aroma de algumas castas (por ex. Cabernet Sauvignon).

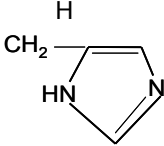
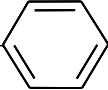
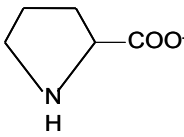
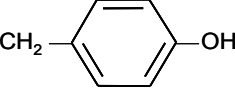
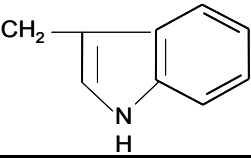
Aminoácidos	Abreviatura	R
Alanina	Ala	$\text{CH}_3$
Arginina	Arg	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C} \begin{matrix} \text{NH}_2 \\ \text{NH}_2^+ \end{matrix}$
Ácido aspártico	Asp	$\text{CH}_2\text{-C} \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}^- \end{matrix}$
Asparagina	Asn	$\text{CH}_2\text{-C} \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$
Citrulina	Cit	$(\text{CH}_2)_3\text{-NH-C} \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$
Cisteína	Cys	$\text{CH}_2\text{-SH}$
Ácido glutâmico	Glu	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C} \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{O}^- \end{matrix}$
Glutamina	Gln	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C} \begin{matrix} \text{O} \\ \parallel \\ \text{NH}_2 \end{matrix}$
Glicina	Gly	$\text{H}$
Histidina	His	
Isoleucina	Ile	$\begin{matrix} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH-CH}_2\text{-CH}_3 \end{matrix}$
Leucina	Leu	$\begin{matrix} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_2\text{-CH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
Lisina	Lys	$(\text{CH}_2)_4\text{-NH}_3^+$
Metionina	Met	$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3$
Ornitina	Orn	$(\text{CH}_2)_3\text{-NH}_3^+$
Fenilalanina	Phe	$\text{CH}_2\text{-}$ 
Prolina*	Pro	
Serina	Ser	$\text{CH}_2\text{-OH}$
Treonina	Thr	$\begin{matrix} \text{OH} \\   \\ \text{CH-CH}_3 \end{matrix}$
Tirosina	Tyr	$\text{CH}_2\text{-}$ 
Valina	Val	$\begin{matrix} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH} \\   \\ \text{CH}_3 \end{matrix}$
Triptofano	Trp	$\text{CH}_2\text{-}$ 

Tabela 7 - Aminoácidos mais importantes encontrados no vinho.

\* - A estrutura da prolina não obedece à estrutura geral dos aminoácidos.

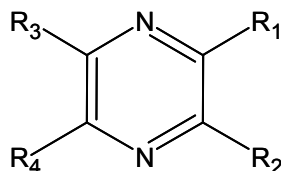


Figura 20 – Estrutura geral das pirazinas.

**Compostos com átomos de enxofre.** Existem dois tipos de compostos de enxofre: leves (ponto de ebulição abaixo de 90 °C) e pesados (ponto de ebulição acima de 90 °C). Estes compostos são produzidos pelas leveduras, durante a fermentação, bem como durante o processo de vinificação, estágio em madeira ou durante a conservação em garrafa. Na **Tabela 8** estão descritos os principais compostos de enxofre leves bem como as concentrações normalmente encontradas no vinho. Apesar da concentração do sulfureto de dimetilo (DMS) ser praticamente zero em vinhos novos, ao fim de um ano pode atingir 6 µg/L atingindo um valor máximo ao fim de 5 a 10 anos (0 – 474 µg/L) (Loubser e Du Plessis, 1976).

Compostos de enxofre de baixo peso molecular	Concentrações no vinho (µg/L)
Sulfureto de hidrogénio (H <sub>2</sub> S)	0,3
Sulfureto de dimetilo (CH <sub>3</sub> -S-CH <sub>3</sub> )	1,4
Metanotiol (CH <sub>3</sub> -SH)	0,7
Etanotiol (CH <sub>3</sub> -CH <sub>2</sub> -SH)	0,1
Dissulfureto de carbono (CS <sub>2</sub> )	1,7

Tabela 8 – Compostos de enxofre de baixo peso molecular (Handbook of Enology, 2000).

Na **Tabela 9** estão descritos os principais compostos de enxofre pesados bem como as concentrações normalmente encontradas no vinho.

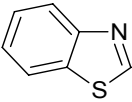
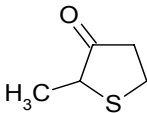
Fórmula	Compostos de enxofre de elevado peso molecular	Concentrações no vinho (µg/L)
$\text{CH}_3\text{-S-S-CH}_3$	Dissulfureto de dimetilo	0,1
$\text{HS-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	2-Mercaptoetanol	72
$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHO}$	3-Metiltiopropional (metional)	20
$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	3-Metiltiopropanol (metionol)	838
$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CHOH-CH}_3$	4-Metiltio-2-butanol	36
	Benzotiazol	2
$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	2-Metiltioetanol	56
	2-Metil-tetra-hidrotiofenona	68
$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}_2$	<i>N</i> -(3-metiltio)propilamina	
$\text{CH}_3\text{-S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CONH-CH}_3$	<i>N</i> -(3-metiltio)propil-acetamida	
$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3$	Propanoato de 3-metiltioetilo	300 - 1500
$\text{CH}_3\text{-COO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3$	Acetato de 3-metiltiopropilo	50 -115

Tabela 9 – Compostos de enxofre de elevado peso molecular (Handbook of Enology, 2000).



## **1.1.2 – Famílias de compostos com reconhecida actividade antioxidante**

### ***1.1.2.1 - Compostos fenólicos***

Os compostos polifenólicos contêm vários subgrupos de ácidos fenólicos e flavonóides. Mais de 5000 polifenóis, incluindo 2000 flavonóides, já foram identificados em plantas, frutos e algas estando este número ainda a crescer (Harborne, 1993). Os compostos fenólicos são importantes antioxidantes naturais devido aos seus elevados potenciais redox que permitem que estes compostos sejam bons agentes redutores, dadores de hidrogénio e com capacidade de reagir com espécies reactivas de oxigénio e de azoto.

O processo oxidativo é iniciado através da oxidação de derivados do catecol tais como a (+)-catequina / (-)-epicatequina, galocatequina, ácido gálico e os seus ésteres, e o ácido caféico, que constituem a família de compostos fenólicos mais facilmente oxidáveis no vinho (Singleton *et al.*, 1987; Singleton *et al.*, 2000; Kilmartin *et al.*, 2000). Estes compostos são oxidados sequencialmente a semiquinonas e quinonas, enquanto que o oxigénio é reduzido a radicais hidroperóxido e peróxido de hidrogénio. Este processo é catalisado pelo ciclo redox  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ . O peróxido de hidrogénio é depois reduzido pelo  $\text{Fe}^{2+}$ , pela reacção de Fenton, a radicais hidroxilo capazes de oxidar grupos hidroxilo de compostos saturados. Radicais intermediários podem também reagir com o oxigénio formando uma via adicional para a sua redução. Assim, ambos os iões férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), que estão presentes no vinho, apresentam uma função catalítica muito importante.

#### 1.1.2.2 - Carotenóides

Os carotenóides, incluindo as xantofilas (carotenóides contendo oxigénio) são compostos naturais que abundam como pigmentos em plantas. Até à data já foram identificados mais de 500 carotenóides, a maioria destes em plantas e algas (Delgado-Vargas *et al.*, 2000). Os carotenóides têm a capacidade de capturar radicais peróxido derivados de lípidos bem como espécies de oxigénio singuleto (Stahl *et al.*, 1997). A capacidade antioxidante dos carotenóides pode estar relacionada com a sua estrutura. Em sistemas muito conjugados, como é o caso da astaxantina, a actividade antioxidante parece aumentar (Miki *et al.*, 1991). Nas uvas, a presença de carotenóides é reconhecida. O  $\beta$ -caroteno e algumas xantofilas são abundantes nas uvas verdes (1 a 5 g/L), decrescendo durante a maturação (1 a 2 g/L) (Oliveira *et al.*, 2003). Estas moléculas podem ser encontradas em vinhos do Porto (Guedes de Pinho *et al.*, 2001) em concentrações que não ultrapassam os 100  $\mu$ g/L.

#### 1.1.2.3 - Produtos da reacção de Maillard

A cor e o sabor dos alimentos podem ser atribuídas ao aquecimento de açúcar e alimentos ricos em açúcar. Os produtos da reacção de caramelização são responsáveis pelo sabor a caramelo bem como pelo desenvolvimento da cor castanha (acastanhamento). Contudo, em sistemas que contenham simultaneamente açúcares e compostos aminados, como aminoácidos, peptídeos ou proteínas, a velocidade desta reacção aumenta. Assim, durante o tratamento por aquecimento a reacção de Maillard pode ter lugar, dando origem a diferentes produtos.

A reacção de Maillard, nos alimentos, ocorre a temperaturas superiores a 50 °C e a um pH óptimo entre 4 e 7 (Morales *et al.*, 2001). No entanto, a caramelização requer temperaturas superiores a 120 °C e um pH óptimo compreendido entre 3 e 9 (Kroh *et al.*, 1994).

A maioria dos estudos de actividade antioxidante com produtos da reacção de Maillard foram conduzidos em sistemas modelo contendo simultaneamente estes produtos e lípidos. Alguns destes sistemas, que desenvolveram produtos da reacção de Maillard, estão indicados na **Tabela 10**. A actividade antioxidante destes produtos foi descrita pela primeira vez em 1954 (Franzke *et al.*, 1954). No entanto, a natureza deste tipo de compostos ainda não é bem conhecida.

A adição de açúcar e/ou aminoácidos a produtos de padaria, tais como bolachas, acelera a reacção de “browning” aumentando a estabilidade contra a oxidação por rancidez (Bressa *et al.*, 1996). O tratamento por aquecimento de vários produtos derivados de leite conduz, no caso específico do leite, à produção de grupos sulfidrilo formados a partir das proteínas do leite que aumentam a estabilidade oxidativa do mesmo (Morales *et al.*, 1998). No caso do café, os grãos de café submetidos a torrefacção têm um poder antioxidante superior aos grãos de café sem esse tratamento, tendo igualmente uma maior concentração em compostos polifenólicos (Fuster *et al.*, 2000). Esta observação sugere que estes produtos da reacção de Maillard têm um poder sinérgico, em adição com os compostos fenólicos, na actividade antioxidante total dos grãos de café.

Compostos de elevado peso molecular como as melanoidinas, são apontados como sendo os produtos maioritários formados por reacções de “browning” não enzimático. As melanoidinas são substâncias complexas de elevado peso molecular, cuja estrutura ainda não é bem conhecida, podendo aparecer em diferentes estágios do processamento de alimentos como o aquecimento de concentrados de sumos e mostos, cervejas e vinhos. Foi reportado que melanoidinas derivadas da D-xilose e da glicina têm uma capacidade antioxidante comparada à de o BHA e o BHT (Hayase *et al.*, 1999).

Além disso, foram demonstrados efeitos sinérgicos deste produto com o tocoferol, BHA e BHT na inibição da auto-oxidação do ácido linoleico (Hayase *et al.*, 1999).

As melanoidinas de alguns “vinhos doces” provenientes de Espanha foram isoladas por diálise (peso molecular > 12000 Da) e a sua actividade antioxidante avaliada pelo método do DMPD (*N,N*-dimetil-*p*-fenilenodiamina). No entanto, os resultados obtidos demonstraram que apesar destas moléculas contribuírem para a cor (Abs a 345 e 420 nm) a sua contribuição para a actividade antioxidante do vinho inicial não é considerável (Rivero-Pérez *et al.*, 2002).

Apesar dos produtos da reacção de Maillard estarem associados primariamente às melanoidinas, esta família de compostos também contempla alguns compostos voláteis, responsáveis pelo aroma de alimentos cozinhados. Recentemente, compostos voláteis obtidos através de sistemas modelo de glucose e cisteína demonstraram ter actividade antioxidante (Eiserich *et al.*, 1994). Da mesma forma, extractos cromatográficos obtidos com diclorometano a partir dos produtos anteriores demonstraram ter inibido a oxidação do hexanal a ácido hexanóico (Shaker *et al.*, 1995). Adicionalmente, vários compostos heterocíclicos contendo azoto e/ou enxofre, que são os principais produtos da reacção de Maillard aromáticos, também exibem actividade antioxidante (Eiserich *et al.*, 1995). Como exemplo, alquiltiofenos, 2-tiofenotiol, 2-metil-3-furanotiol, furfurilmercaptano, 2-tiotiazolina e o imidazol, que se encontram no café e no vinho, inibem a oxidação do hexanal durante mais de 30 dias. Para além disso, também possuem actividade antioxidante em sistemas que envolvem a peroxidação lipídica e métodos que envolvem a captura do radical tirosilo. O 1-metilpirrol e vários dos seus 2-alquil homólogos inibem a oxidação do pentanal e do hexanal (Macku *et al.*, 1991). O 2-metilfurano exhibe a maior actividade antioxidante entre a família dos furanos. Da mesma forma, o 2-metiltiofeno exhibe a maior actividade antioxidante entre a família dos tiofenos (Eiserich *et al.*, 1995). Em geral, os tiazóis têm cerca de um décimo da actividade antioxidante do BHT.

Descrição do sistema	Referência
Pré-gelatinização de amido, glucose e lisina	Mastrocola <i>et al.</i> , 2000
Cisteína e glucose	Eiserich <i>et al.</i> , 1992; Shaker <i>et al.</i> , 1995)
Glucose ou lactose, lisina, alanina ou glicina	Morales <i>et al.</i> , 2001
Derivados de tomate aquecido e café torrado	Nicoli <i>et al.</i> , 1997
Compostos heterocíclicos	Fuster <i>et al.</i> , 2000; Eiserich <i>et al.</i> , 1994 e 1995
Óleo de milho e glicina	Macku <i>et al.</i> , 1991
Glucose/lisina e Frutose/lisina	Jing <i>et al.</i> , 2000
Frutose e arginina	Ide <i>et al.</i> , 1999
Glucose ou frutose e ácido glutâmico	Anese <i>et al.</i> , 1999

Tabela 10 – Estudos de actividade antioxidante de alguns sistemas que desenvolveram produtos da reacção de Maillard.

## **1.2 – Processos de separação utilizados na extracção de antioxidantes naturais**

Neste trabalho pretendeu-se conhecer a natureza das espécies envolvidas na resistência à oxidação. Para isso, desenvolveu-se uma técnica de fraccionamento prévio do vinho para separação e extracção dos compostos com possível poder antioxidante. Neste ponto irão ser abordados alguns dos processos mais utilizados na extracção de compostos antioxidantes.

Existem diferentes processos de extracção de antioxidantes naturais. A natureza do material de partida bem como a sua bioactividade têm de ser consideradas de modo a obter uma extracção eficiente. A lipofilicidade ou hidrofiliicidade dos antioxidantes tem também um grande impacto na eficiência da extracção quando utilizamos solventes orgânicos. Alguns compostos como lenhinas ou procianidinas, que podem estar esterificados ou polimerizados, podem sofrer processos de hidrólise antes da sua extracção.

Diferentes métodos podem ser utilizados na extracção de antioxidantes naturais. No entanto, a maior parte destes métodos envolvem a extracção por solventes utilizando água, solventes orgânicos ou gases líquidos, ou combinações

entre eles usando diferentes condições de temperatura e de pressão, embora outros métodos como pressão física, filtração, destilação ou adsorção sólida (líquida ou em fase gasosa) possam igualmente ser utilizados.

O processo de extracção a utilizar é determinado pelo tipo de antioxidantes a extrair e pelo objectivo da extracção (qualitativo ou quantitativo). Em geral, os antioxidantes polares, como são o caso dos ácidos fenólicos e glicosídeos de vários flavonóides, são extraídos com água, álcoois, ou misturas destes solventes. Para antioxidantes do tipo das agliconas de alguns flavonóides e a maior parte dos carotenóides são utilizados solventes orgânicos.

O metanol é normalmente mais utilizado do que o etanol devido ao seu maior poder de extracção. Soluções de metanol e água entre os 50 % e os 80 % já foram utilizadas na extracção de ácidos hidroxicinâmicos e várias famílias de flavonóides. Quanto maior a percentagem de água utilizada na composição do solvente de extracção, maior o poder de extracção de glicosídeos destes compostos.

A extracção por solventes é um método que apresenta uma elevada percentagem de recuperação de antioxidantes naturais. No entanto, a utilização de elevadas quantidades de solventes orgânicos é prejudicial para o meio ambiente e para a saúde. Existem vários métodos alternativos, utilizados na extracção de antioxidantes naturais, que eliminam ou reduzem significativamente o uso de solventes orgânicos.

A extracção em fase sólida (SPE) utiliza adsorventes sólidos para extrair os compostos antioxidantes de matrizes líquidas como é o caso de sumos, cervejas ou vinhos. É uma técnica fácil, rápida e económica, quando comparada à técnica de extracção por solventes. No entanto, esta técnica é maioritariamente usada na purificação e pré-concentração de amostras devido à selectividade e saturação dos adsorventes utilizados.

Mais recentemente, têm vindo a ser utilizadas outras técnicas de extracção como a extracção assistida por microondas (MAE), a extracção por fluido super-crítico (SFE) e a extracção pressurizada por líquidos (PLE).

A extracção assistida por microondas (MAE) é uma técnica relativamente nova que combina as microondas com o uso tradicional de solventes. Nesta técnica é importante que o solvente de extracção utilizado tenha uma boa polaridade uma vez que, solventes com elevada constante dieléctrica (polares) absorvem maior energia na zona das microondas resultam numa maior eficiência de extracção (Hong *et al.*, 2001). Esta técnica oferece algumas vantagens tais como: 1 – tempo curto de extracção (alguns minutos); 2 – volume reduzido de solventes; 3 – maior eficiência de extracção.

A determinados valores de pressão e temperatura, certos gases, como o CO<sub>2</sub>, podem ser liquefeitos a um estado chamado de fluido super-crítico. Estes fluidos possuem simultaneamente características de gases e de líquidos. A extracção por fluido super-crítico (SFE) tira partido de ambas as características do gás e do líquido. As características de gás ajudam à difusão nos fluidos na matriz tornando-os acessíveis aos compostos antioxidantes, enquanto que as características de líquido proporcionam um maior poder de solvatação destes compostos. A maior vantagem deste método de extracção é que se trata de método limpo, não tóxico e quimicamente inactivo. Por outro lado, trata-se de um método muito dispendioso. A eficiência da extracção pode ser optimizada modificando a densidade do CO<sub>2</sub>, pela adição de solventes orgânicos. Este tipo de extracção dada a sua apolaridade é mais utilizado em antioxidantes do tipo carotenóide e outros compostos relativamente lipofílicos (Sábio *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2002).

A extracção pressurizada por líquidos (PLE) ou extracção acelerada por solventes tem sido utilizada na extracção de resíduos ligados a pesticidas. Esta tecnologia só recentemente foi utilizada em antioxidantes naturais (Palma *et al.*, 2001; Piñeiro *et al.*, 2004). Na extracção pressurizada por líquidos são utilizadas altas pressões e temperaturas de modo a obter uma elevada taxa de

recuperação. No entanto, a elevadas temperaturas alguns compostos fenólicos como a catequina e a epicatequina podem sofrer degradação (14 % a 150 °C) (Palma *et al.*, 2001).

### **1.3 – Metodologias utilizadas para avaliar a actividade antioxidante**

Neste trabalho foram aplicadas metodologias para avaliar a actividade antioxidante de fracções de vinho, após separação e extracção do mesmo. Neste ponto irão ser abordados alguns dos métodos mais utilizados na avaliação da actividade antioxidante de alimentos e sistemas biológicos.

Diferentes substratos, sistemas, e métodos analíticos são utilizados para avaliar o poder antioxidante de diferentes moléculas. Desta evidência conclui-se que vários e diferentes métodos são necessários para avaliar a eficácia dos diferentes antioxidantes. A interpretação do poder antioxidante de antioxidantes



naturais tem de ter em conta o sistema bem como o método analítico utilizado para determinar a extensão e o termo da oxidação.

Diferentes metodologias são referidas na literatura com o objectivo de medir a “resistência à oxidação” de alimentos e sistemas biológicos. Estes testes podem ser classificados em 3 grandes grupos: testes usados para avaliar a peroxidação lipídica, em que um lípido ou uma lipoproteína são usados como substrato (Sánchez-Moreno e Larrauri, 1998), testes usados para medir a actividade antiradicalar, baseados na captura de radicais livres, e testes electroquímicos, em que a extensão e o termo da oxidação são avaliados electroquimicamente. Para além destas metodologias existe um método específico para medir compostos fenólicos totais (índice de Folin-Ciocalteu).

### 1.3.1 – Métodos baseados na peroxidação lipídica

Um dos testes utilizados para avaliar a peroxidação lipídica baseia-se numa peroxidação de lípidos sinaptossomais através de espécies reactivas de oxigénio geradas a partir do oxigénio molecular por um sistema  $\text{FeCl}_2 / \text{FeCl}_3$ , (**Figura 21**) (Braugher *et al.*, 1986). A partir deste sistema, o  $\text{Fe}^{2+}$  é oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  gerando o radical superóxido  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e a consequente formação do radical hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ) com a interconversão  $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$  (**Figura 21**). O produto desta oxidação (aldeídos) reage posteriormente com o ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo o malonaldeído (MDA), um aldeído com 3 átomos de carbono, um dos principais produtos formados neste processo oxidativo. Neste ensaio o MDA reage com o

TBA, na proporção de 1 para 2, para formar um composto de cor vermelha (**Figura 22**), o qual absorve a 532-535 nm e apresenta máximos de absorção secundários a 245 e 305 nm. A reacção ocorre em meio ácido (pH 1-2) e a alta temperatura (100 °C), no sentido de aumentar a sua velocidade e sensibilidade. Como padrão, para a análise quantitativa, é usado normalmente o 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP), o qual liberta MDA e etanol, após hidrólise ácida.

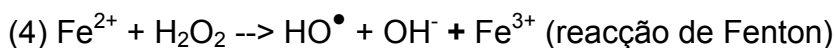
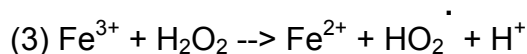
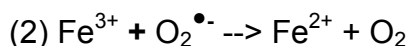
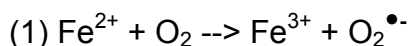


Figura 21 – Geração de espécies reactivas de oxigénio a partir de um sistema  $\text{Fe}^{2+} / \text{Fe}^{3+}$ .

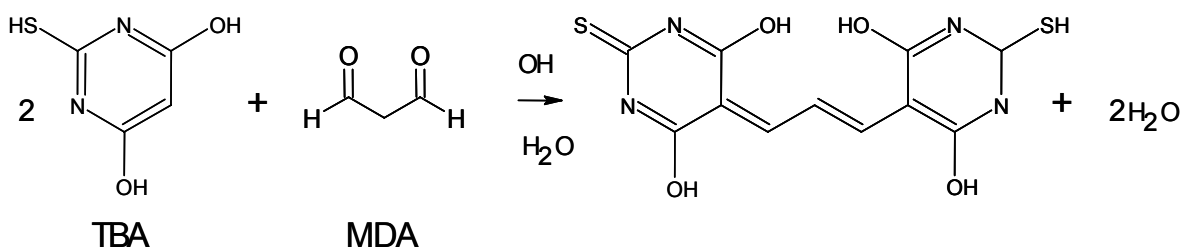


Figura 22 – Formação de um composto de cor vermelha a partir da reacção de TBA com MDA.

### 1.3.2 – Métodos baseados na captura de radicais livres

#### 1.3.2.1 – Captura do radical hidroxilo ( $\text{HO}^{\bullet}$ )

Um dos métodos mais utilizados para avaliar a captura de radicais hidroxilo ( $\text{HO}^{\bullet}$ ) é o método da desoxirribose, onde a velocidade da reacção do radical hidroxilo com a desoxirribose, em presença ou ausência de um antioxidante, é medida através de leituras espectrofotométricas, (Aruoma *et al.*, 1994). Neste

método, uma mistura de  $\text{FeCl}_3$  e EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), na presença de ácido ascórbico (reductor), dá origem ao complexo  $\text{Fe(II)-EDTA}$ , que é depois oxidado através de  $\text{H}_2\text{O}_2$  originando o complexo  $\text{Fe(III)-EDTA}$  e o radical  $\text{HO}^\bullet$ , através da reacção de Fenton (**Figura 21, 4**).

Estes radicais ( $\text{HO}^\bullet$ ) reagem com a molécula de desoxirribose, degradando-a em vários fragmentos que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBA), por aquecimento e a pH baixo, dando origem a um composto cromogénico rosa detectado espectrofotometricamente. A adição de um antioxidante ao meio reaccional retarda o aparecimento do composto cromogénico sendo o grau de inibição da degradação da desoxirribose relacionado com a actividade antiradicalar do antioxidante adicionado.

#### 1.3.2.2 – Captura do radical peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ )

Os radicais peroxilo ( $\text{ROO}^\bullet$ ) são radicais usualmente encontrados em sistemas biológicos e utilizados em métodos de avaliação da actividade antioxidante. Estes radicais são ligeiramente menos reactivos do que os radicais hidroxilo ( $\text{HO}^\bullet$ ), possuindo um tempo de semi-vida de segundos contra alguns nanossegundos correspondentes ao radical  $\text{HO}^\bullet$  (Halliwell *et al.*, 1984).

Métodos utilizando azo-compostos são muito utilizados em metodologias que envolvem radicais peroxilo. Uma das metodologias utilizadas usa como gerador de radicais livres o di-hidrocloreto de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH) (**Figura 23**). Este composto é solúvel em água e a sua decomposição produz uma molécula de azoto e dois radicais alquilo que podem combinar entre si, originando produtos mais estáveis, ou reagir com o oxigénio molecular para dar origem a radicais peroxilo (**Figura 24**). O tempo de semi-vida do AAPH é de cerca de 175 horas (37 °C, pH neutro), sendo a velocidade de geração dos radicais livres constante durante as primeiras horas em solução (Niki, E., 1990). Estes

radicais vão oxidar a albumina, sendo o produto desta reacção (compostos contendo grupos carbonilo) quantificado espectrofotometricamente (Keller *et al.*, 1993) para avaliar a actividade antioxidante do composto adicionado.

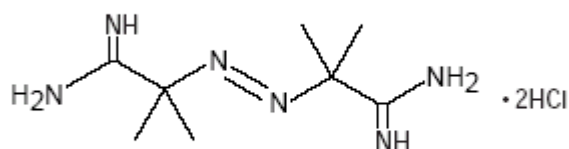


Figura 23 – Estrutura do di-hidrocloreto de 2,2'-azobis-2-amidinopropano (AAPH).

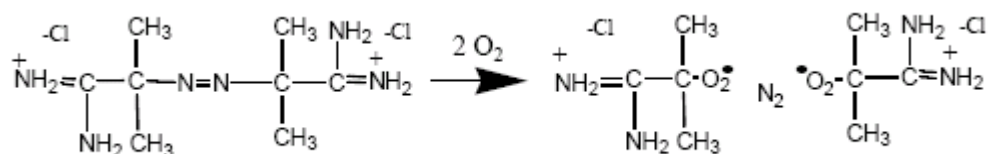


Figura 24 – Geração de radicais peroxilo a partir do AAPH.

### 1.3.2.3 – Método do ABTS para estimar a actividade antiradicalar

ABTS – Base do método

O método do ABTS, ácido 6-[2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolinil)] sulfónico, (**Figura 25**) é baseado na inibição, pela adição de antioxidantes, da absorvância

do catião-radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (**Figura 26**), caracterizado pela absorção máxima de uma banda a 417 nm e absorções secundárias a 660, 734 e 820 nm. O método original, metilmioglobina/ABTS, descrito por Miller *et al.* (1993) e Rice-Evans e Miller (1994), é baseado na activação da metilmioglobina que, actuando como peroxidase por acção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , dá origem à formação do radical ferrilmioglobina. Este radical vai posteriormente oxidar o ABTS, formando um agente cromogéneo catião-radical altamente estável, o catião-radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ .

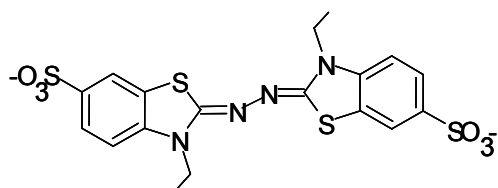


Figura 25 – Estrutura do ácido 6-[2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolinil)] sulfónico (ABTS).

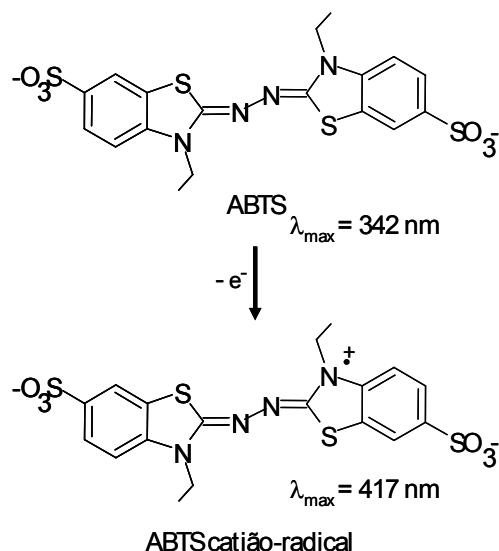


Figura 26 – Formação do catião-radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ .

Em termos de medição da actividade antioxidante total (TAA) diferentes estratégias analíticas podem ser utilizadas e são baseadas na descoloração ou inibição da formação do catião-radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ . No método da

metilmioglobina/ABTS, proposto por Miller *et al.* (1993) e Rice-Evans e Miller (1994), a adição de um antioxidante ao meio reaccional retarda o aparecimento do catião-radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  sendo o período de tempo observado até que se forme o radical registado e relacionado com o produzido por referências de concentração conhecida. Estes autores, Rice-Evans e Miller (1997), descobriram mais tarde que os resultados obtidos pelo método da metilmioglobina/ABTS ou por o método da descoloração do ABTS, em que o radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  é gerado directamente pela redução química de dióxido de manganês na ausência de proteínas ou da reacção com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , são semelhantes. Mais recentemente, uma modificação ao método original foi introduzida por Re *et al.* (1999), em que o catião-radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  é gerado directamente pela adição de persulfato de potássio. O radical é de seguida misturado com o antioxidante sendo a percentagem de inibição da absorvância a 734 nm calculada em função da concentração dos antioxidantes.

No método do ABTS o grau de inibição obtido relaciona-se com o produzido por referências de concentração conhecida de um análogo sintético da vitamina E, ácido (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-cromonil) fórmico (“Trolox”) (**Figura 27**). Esta comparação permite rotular o método de “TEAC” – Capacidade Antioxidante em Equivalentes de Trolox.

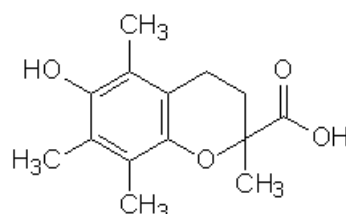


Figura 27 – Estrutura do ácido (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-cromonil) fórmico (Trolox).

A geração dos radicais livres antes da adição de antioxidantes previne interferências de compostos que afectem a formação dos mesmos. Uma vez que o radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  pode ser dissolvido em água ou em soluções de etanol, este método pode ser utilizado na medição de actividade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos.

O mecanismo da reacção do catião radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  com os antioxidantes pode ser por doação de átomos de hidrogénio, por transferência de electrão ou ainda através de uma combinação destes dois mecanismos (Rice-Evans *et al.*, 1996; Tyrakowska *et al.*, 1999; Pannala *et al.*, 2001).

#### ABTS – Aplicações do método

O método da metilmioglobina/ABTS já foi aplicado a flavonóides e ácidos fenólicos derivados da fase aquosa de plantas (Rice-Evans *et al.*, 1995; 1997). A contribuição relativa do ácido ascórbico e de compostos fenólicos para a actividade antioxidante de sumos de laranja e maçã assim como bebidas contendo groselha foi avaliada pelo mesmo método (Rice-Evans e Miller 1997). O estado de antioxidantes lipossolúveis em plasma de pacientes com doença de Crohn (Genser *et al.*, 1999), o efeito “in vivo” dos antioxidantes do chá verde (Sung *et al.*, 2000) e o efeito da vitamina E e de  $\beta$ -caroteno como suplementos dietéticos na actividade antioxidante do plasma (Calzada *et al.*, 1995) foram também avaliados pelo método anterior.

Pelo mesmo método foram estimados os valores “TEAC” (Capacidade Antioxidante em Equivalentes de Trolox) de polifenóis poliméricos (Hagerman *et al.*, 1998), misturas de antocianinas (Degenhardt *et al.*, 2000) e extractos de metanol de plantas (Alzoreky e Nakahara, 2001).

Utilizando o método da descoloração do ABTS, em que o radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  é gerado directamente pela redução química de dióxido de manganês, foi avaliado o efeito antioxidante da quercetina, derivada da cebola, bem como de sumos de

frutos (Young *et al.*, 1999). A capacidade antioxidante de carotenos e xantofilas (Miller *et al.*, 1996), vinhos (Fogliano *et al.*, 1999), fracções insolúveis em água derivadas de tomate (Leonardi *et al.*, 2000), fracções de 3-flavonóis de grainhas de uvas (Castillo *et al.*, 2000) e flavonóides (Benavente-Garcia *et al.*, 2000) foi também avaliada pelo método anterior.

O método da metilmioglobina/ABTS, em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, já foi aplicado na determinação da actividade antioxidante de compostos fenólicos derivados de cereais (Zielinski *et al.*, 2000), compostos polifenólicos derivados de vinho tinto (Simonetti *et al.*, 1997), chá verde e preto (Liebert *et al.*, 1999), plantas medicinais seleccionadas (Pietta *et al.*, 1998) e cerveja (Szwajgier *et al.*, 2000).

Mais recentemente este método foi utilizado para avaliar a actividade antioxidante de proantocianidinas de plantas medicinais (Maldonado *et al.*, 2005), compostos fenólicos da pimenta verde (Chatterjee *et al.*, 2007) e na definição de uma relação entre a estrutura e a actividade antioxidante de vários compostos fenólicos (Nenadis *et al.*, 2004).

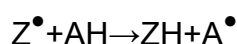
#### *1.3.2.4 – Método do DPPH para estimar a actividade antiradicalar*

DPPH – Base do método

O 2,2–difetil-1-picril-hidrazilo (**Figura 28:1**) é um radical livre estável. A deslocalização da carga (conjugação) desta molécula faz com que o radical seja estável e que a molécula não dimerize. A deslocalização dá também origem a uma cor violeta caracterizada pela absorção de uma banda entre 515-528 nm na zona do visível, numa solução em etanol (Molyneux, 2004).



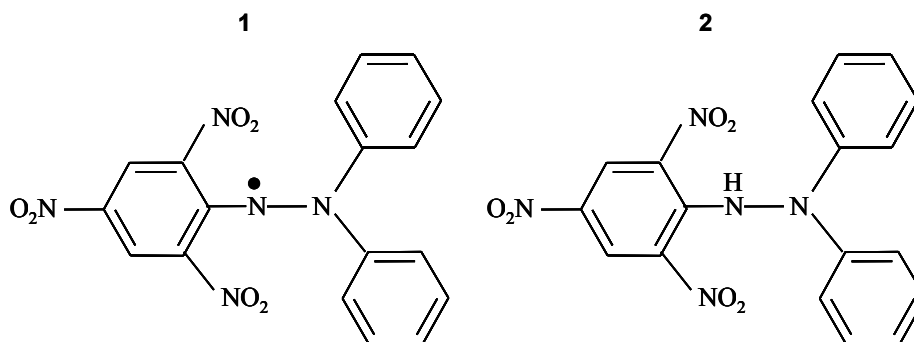
Quando uma solução de DPPH<sup>•</sup> é misturada com uma substância que possa doar átomos de hidrogénio, a molécula 1 (**Figura 28:1**) passa à forma reduzida (**Figura 28:2**), não radical, com a perda da cor violeta e aparecimento de uma cor amarela residual atribuída ao grupo picrilo ainda presente. Representando o radical DPPH como Z<sup>•</sup> e a molécula doadora de átomos de hidrogénio por AH podemos escrever a reacção:



Onde ZH é a forma reduzida do DPPH<sup>•</sup> e A<sup>•</sup> é um radical livre produzido pela reacção anterior (Molyneux, 2004). Esta capacidade de reacção com moléculas doadoras de átomos de hidrogénio pode ser avaliada utilizando métodos espectroscópicos de ressonância electrónica de spin, sabendo que a intensidade do sinal produzido pelo DPPH<sup>•</sup> é inversamente proporcional à concentração do antioxidante adicionado ao meio reaccional (Sánchez-Moreno, 2002). Contudo, a medição da descoloração do DPPH<sup>•</sup> (entre 515-528 nm) produzida pela adição do antioxidante e efectuada por espectrofotometria no visível é a técnica mais utilizada para avaliar a reacção anterior.

Mais recentemente, foi proposto um mecanismo de transferência de electrão seguido de transferência de protão para a reacção do radical DPPH<sup>•</sup> com os antioxidantes (Foti *et al.*, 2004). A contribuição do mecanismo de transferência de átomos de hidrogénio, descrita anteriormente, ou da transferência de electrão seguida de transferência de protão depende da natureza do solvente e/ou dos potenciais redox das espécies envolvidas. Geralmente, para solventes apolares, o mecanismo de transferência de átomos de hidrogénio é favorecido enquanto que, para solventes polares, o mecanismo de transferência de electrão seguido de

transferência de protão parece ser destacado (Foti *et al.*, 2004; Nakanishi *et al.*, 2005; Musialik *et al.*, 2005).



1: radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo; 2: 2,2-difenil-1-picril-hidrazina

Figura 28 – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo e 2,2-difenil-1-picril-hidrazina.

Neste método é muitas vezes utilizado um parâmetro cinético, o “ $\text{IC}_{50}$ ”. Este parâmetro é dado pela concentração de substrato que causa 50 % de perda de actividade do  $\text{DPPH}^\bullet$  e foi introduzido por Brand-Williams e seus colaboradores em 1995 tendo sido usado para avaliar a eficiência da concentração dos substratos utilizados.

#### DPPH – Aplicações do método

O método do DPPH, pela sua fácil e precisa utilização, é recomendado para medir a actividade antioxidante de frutos e sumos ou extractos vegetais, sendo os seus resultados reprodutíveis e facilmente comparáveis com outros métodos envolvendo radicais livres como é o caso do método do ABTS (Sánchez-Moreno, 2002). Ambos os radicais ( $\text{DPPH}^\bullet$  e  $\text{ABTS}^{\bullet+}$ ) envolvidos nos métodos anteriores apresentam a mesma estequiometria com o Trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E): 2 moles de  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  (Cano *et al.*, 1998) ou 2 moles de  $\text{DPPH}^\bullet$  (Leong e Shui, 2002) para reagir com 1 mole de Trolox. Os resultados obtidos da actividade antioxidante utilizando o método do DPPH mostram que a interacção com o potencial antioxidante depende da estrutura da molécula. O

método do DPPH não é referenciado na medição da actividade antioxidante do plasma, devido à precipitação das proteínas no meio reaccional (alcoólico).

Este método já foi utilizado para avaliar a actividade anti-radicalar de taninos hidrolisáveis (Lin *et al.*, 1974; Yoshida *et al.*, 1989), compostos polifenólicos (Brand-Williams *et al.*, 1995; Bondet *et al.*, 1997; Yokozawa *et al.*, 1998), ácidos fenólicos e derivados (Silva *et al.*, 2000), ácidos fenólicos em matrizes de óleo (Pekkarinen *et al.*, 1999), compostos com ácido hidroxicinâmico (Chen e Ho, 1997), flavonóides (Lebeau *et al.*, 2000; Madsen *et al.*, 2000; Burda e Oleszek, 2001), hidroxiflavonas (Cotelle *et al.*, 1996), procianidinas (Saint-Cricq de Gaulejac *et al.*, 1999), catequinas (Sawai e Sakata, 1998), resveratrol (Wang *et al.*, 1999; Tadolini *et al.*, 2000), ácidos linoleicos conjugados (Yu, 2001), polissacarídeos (xantanas, goma tragacanta e metilcelulose) em emulsões (Shimada *et al.*, 1992), fucoxantina (Nomura *et al.*, 1997), taninos derivados de ervas orientais (Yokozawa *et al.*, 1998), fenóis derivados de plantas de chá (Von Gadow *et al.*, 1997), extractos de metanol e acetato de etilo contendo polifenóis (Kim, 2001), polifenóis da maçã (Lu e Foo, 2000), ácidos fenólicos de sumos de laranja não processados (Rapisarda *et al.*, 1999), taninos não fenólicos (Amarowicz *et al.*, 2000), ácido gálico, catequina e estilbenos (Chen *et al.*, 1999), quercetina (Suh *et al.*, 1999), garcinol (Yamaguchi *et al.*, 2000a, b), óleos essenciais de citrinos (Choi *et al.*, 2000), fracções de óleo (Espín *et al.*, 2000a; Gordon *et al.*, 2001), misturas de ceras de abelha (Scheller *et al.*, 1990), antocianinas derivadas de uvas (Espín *et al.*, 2000b), curcumina (Noguchi *et al.*, 1994; Screejayan e Rao, 1996), agentes anti acastanhamento (Kubo *et al.*, 2000), produtos de reacção de Maillard (Yen e Hsieh, 1998; Chevalier *et al.*, 2001; Morales e Jiménez-Pérez, 2001; Tressi *et al.*, 1998), chá (Yen e Chen, 1995; Nanjo *et al.*, 1996), uvas (De Ancos *et al.*, 2000; Fukumoto e Mazza, 2000), vários produtos vegetais comestíveis (Miller *et al.*, 2000; Du Toit *et al.*, 2001; Leong e Shui, 2002), óleos (Jiménez *et al.*, 1993) e conhaques (Da Porto *et al.*, 2000).

Este método também já foi aplicado a diferentes alimentos processados como é o caso de alimentos processados contendo cereais (Minamiyama *et al.*, 1994), compotas de framboesa e uva (Zafrilla *et al.*, 2001; Amakura *et al.*, 2000),

proteínas de batata armazenadas (Hou *et al.*, 2001), sumo de romã processado (Gil *et al.*, 2000) e vinhos (Larrauri *et al.*, 1999).

#### 1.3.2.5 – ESR e sensores de fluorescência

Os mecanismos de captura de radicais pelos antioxidantes são baseados em reacções de transferência de protão ou em reacções redox. Estas reacções podem ser monitorizadas via ESR (espectroscopia de ressonância de spin electrónico) (Mason, R. P. 2004), ou por sensores de fluorescência onde o sinal dos radicais é avaliado pela emissão de radiação quando estes ficam covalentemente ligados a fluoróforos (Tang *et al.*, 2006; Neil *et al.*, 1988; Aliaga *et al.*, 2003; Sonnen *et al.*, 2005).

Em certas reacções em solução um radical pode interagir com um reagente diamagnético para formar um radical mais estável. O produto desta reacção é então identificado e quantificado por EPR/ESR (ressonância paramagnética de electrão/ espectroscopia de ressonância de spin electrónico). A este processo chama-se “spin trapping” e é utilizado para monitorizar reacções que envolvem radicais pouco estáveis e/ou em baixas concentrações (Compendium of Chemical Terminology: The Gold Book, Second Edition, 1997).

### 1.3.3 – Índice de Folin-Ciocalteu – compostos fenólicos totais

O índice de Folin-Ciocalteu é o resultado obtido pela reacção do reagente de Folin-Ciocalteu com o conjunto de compostos fenólicos existentes no vinho. Este reagente é constituído por uma mistura de ácido fosfotúngstico ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ) e de ácido fosfomolibdico ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) que é reduzido, aquando da oxidação dos fenóis, numa mistura de óxidos azuis de tungsténio ( $\text{W}_8\text{O}_{23}$ ) e de molibdénio ( $\text{Mo}_8\text{O}_{23}$ ). A cor azul produzida (Abs 750 nm) é proporcional à taxa de compostos fenólicos existentes no vinho (Regulamento (CEE) nº 2676/90 da Comissão de 17 de Setembro de 1990 Nº 41).

### 1.3.4 – Métodos electroquímicos

Um método desenvolvido por Alonso *et al.* (2000) propõe um teste electroquímico, o “Índice Antioxidante Electroquímico” (EAI), inspirado no método proposto por Miller *et al.* (1993), sendo a formação do catião-radical  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  baseada numa oxidação electroquímica acelerada (Palma 1996, patente nº P9601884; Palma, 2002). Em relação ao método de Miller *et al.* (1993) a formação do  $\text{ABTS}^{\bullet+}$  por oxidação electroquímica é obtida num tempo curto e não necessita de usar outros reagentes ou de controlar reacções e temperaturas.

Outro teste electroquímico, proposto por Mannino *et al.* (1998) quantifica os compostos fenólicos mais facilmente oxidáveis para avaliar o poder antioxidante do vinho. Um detector electroquímico operando a uma corrente constante de 400 mV permite detectar os compostos fenólicos mais facilmente oxidáveis por injeção directa num sistema de FIA (Análise por Injeção de Fluxo). A escolha deste valor (400 mV) deve-se ao facto deste corresponder, segundo a literatura, ao potencial de oxidação dos antioxidantes mais fortes. A quantificação é possível utilizando uma curva de calibração de soluções referência de (+) –catequina, sendo o resultado do poder antioxidante expresso em equivalentes de catequina

(CE). É importante realçar que esta metodologia foi desenvolvida para o estudo do poder antioxidante dos vinhos.

Mais recentemente, foi apresentado um método electroquímico baseado em voltametria cíclica, desenvolvido por Kilmartin *et al.* (2000). Este método foi utilizado no estudo das propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos do vinho. Soluções de antioxidantes (naturais e exógenos) a várias concentrações foram analisadas por um sistema bioanalítico (BAS). Os ciclos voltamétricos foram medidos num intervalo compreendido entre -100 e 1200 mV. Desta maneira é procurada a existência dos processos redox bem como os respectivos potenciais formais de oxidação. Estes trabalhos permitem avaliar a irreversibilidade de certas substâncias, caso do SO<sub>2</sub>, ou pouco reversíveis tais como o ácido ascórbico, o ácido gálico ou o ácido vanílico. A ordenação destes compostos, em função do poder antioxidante, foi também efectuada obtendo-se em termos de mais facilmente oxidável, a seguinte sequência (**Figura 29**): ácido ascórbico, quercetina, (-) -epicatequina, (+) -catequina, ácido gálico e ácido caféico, sendo os menos oxidáveis o ácido ferúlico, a malvidina e o *trans*-resveratrol.

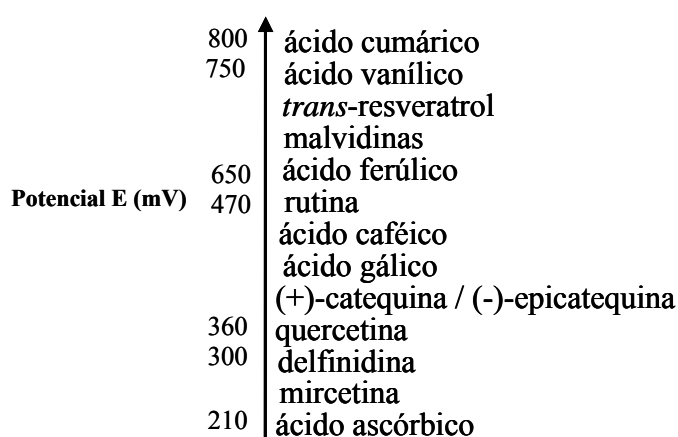


Figura 29 – Potencial de redução de alguns compostos fenólicos e do ácido ascórbico segundo Kilmartin *et al.* (2000).

É importante salientar que nestes diferentes trabalhos se verifica uma discrepância na medida do “poder antioxidante” de várias moléculas, mesmo quando utilizada a mesma metodologia, como demonstra o estudo comparativo efectuado por Alonso *et al.* (2000).

Finalmente, um método proposto por Oliveira *et al.* (2002) determina a “resistência à oxidação”, em vinhos brancos, através de titulações potenciométricas. A titulação potenciométrica de 50 mL de vinho faz-se com 7 mL de solução redutora (1 mL de  $\text{TiCl}_3$  15 % em 100 mL de HCl 1M), imediatamente seguida de uma titulação de oxidação com uma solução de diclorofenolindofenol a 0.05 % (m/v). As concentrações nos titulantes foram determinadas, após um período experimental, até obter as curvas mais reprodutíveis. As titulações são seguidas com um eléctrodo combinado de platina (METTLER, TOLEDO), em condições inertes (com adição de azoto a 100 ml/min) e de maneira automatizada com um sistema Titrab (Radiometer, Dinamarca). Este método avalia as espécies mais facilmente oxidáveis com um potencial de oxidação até 300 mV, imposto pelo oxidante utilizado e, por isso, com maior poder antioxidante.

A escolha dos métodos a serem utilizados neste trabalho (ABTS e DPPH) que são métodos baseados na captura de radicais livres deve-se ao facto de ambos os métodos já terem sido extensivamente utilizados para medir a actividade antioxidante de vinho, de serem ambos de fácil e precisa utilização e ambos os radicais ( $\text{ABTS}^{\bullet+}$  e  $\text{DPPH}^\bullet$ ) apresentarem a mesma estequiometria com o trolox e o ácido ascórbico, que são dois reconhecidos compostos antioxidantes utilizados como referência na avaliação da actividade antioxidante. Além disso, estes métodos estão relacionados com a avaliação de radicais livres no organismo onde os antioxidantes reduzem a agressividade dos radicais livres de oxigénio (principal causa de envelhecimento). Estes radicais formam-se no organismo por influências de vários factores: poluição, tabagismo, consumo excessivo de alguns alimentos (gorduras, álcool, açúcar, etc.), processos inflamatórios ou infecciosos, traumatismos, stress, exercício físico aeróbico, etc.

### ***1.4 - Aplicações de técnicas de RMN em vinhos***

O SNIF-NMR (fracionamento isotópico específico – ressonância magnética nuclear) é um método analítico de ressonância magnética nuclear com o qual é possível examinar componentes de várias biomoléculas com um elevado grau de precisão. Enquanto que a maioria dos métodos analíticos convencionais são aplicados apenas a nível molecular, o SNIF-NMR é sensível a nível atómico e produz uma “impressão digital” isotópica única para uma grande variedade de substâncias (EUROFINS SCIENTIFIC). Este método é usado não só para verificar a pureza dos produtos estudados, mas também para identificar a sua origem. Isto significa que este método pode ser uma ferramenta útil na garantia de autenticidade, qualidade e segurança de várias bio substâncias, como é o caso do vinho. Esta “impressão digital” é baseada na composição atómica das biomoléculas. Os átomos das moléculas biológicas podem conter diferentes massas atómicas, sendo designados por isótopos. Estes isótopos estão presentes numa certa frequência relativa dependente da origem, processamento e técnicas de produção aplicadas às moléculas. Assim, cada molécula irá ter uma proporção, relação e posição de isótopos característica. Pela determinação destes parâmetros e uso da ressonância magnética nuclear, é possível determinar o perfil isotópico típico de cada molécula obtendo, assim, a sua “impressão digital



isotópica”. O método é usado para detectar fraudes em vinhos, nomeadamente na determinação de etanol (Cross *et al.*, 1998; IVV Portugal).

Outro método de ressonância magnética nuclear que consegue detectar se um vinho se estragou sem abrir a garrafa, utiliza uma sonda especial de RMN em que a garrafa é colocada inteira directamente no magnete (Weekley *et al.*, 2002, 2003). O etanol do vinho pode ser oxidado a ácido acético ou a acetaldeído. Um vinho é considerado estragado se contiver ácido acético em concentrações de 1,4 g por litro ou acetaldeído a 300 mg por litro. Existe ainda um segundo tipo de azedamento também designado tingimento da rolha que é causado pelo aparecimento de bolores na rolha. Cerca de 5 a 10 % de garrafas de vinho podem estragar-se por uma destas duas maneiras. No entanto, este método de RMN detecta apenas aquelas afectadas por oxidação. A diferença nos desvios químicos dos prótons metílicos do ácido acético e do acetaldeído para o etanol é de cerca de 1 ppm, que é o suficiente para distinguir os compostos facilmente. Augustine (2005) está a criar uma companhia, chamada "WineScanner", para testar vinhos no mercado de leilões.

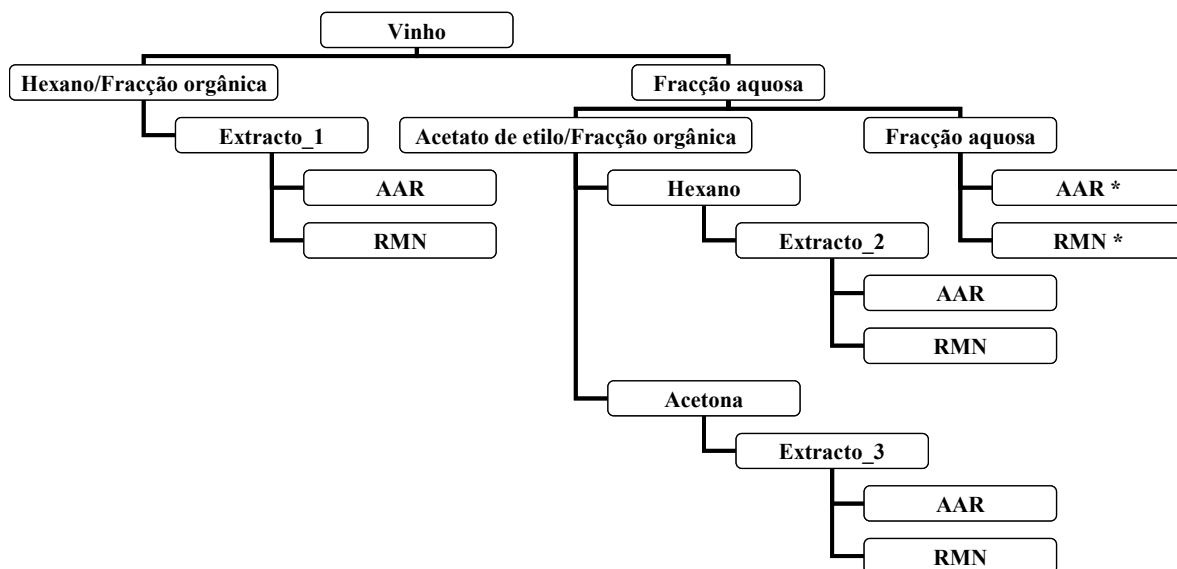
## Capítulo 2 – Parte Experimental

2 - Parte Experimental.....	49
2.1 – <i>Fraccionamento de vinho branco</i> .....	49
2.2 - <i>Protocolo de envelhecimento forçado de vinho branco</i> .....	52
2.3 - <i>Métodos utilizados para avaliar a actividade antioxidante</i> .....	54
2.3.1 - Método – ABTS.....	55
2.3.2 - Método – DPPH .....	57
2.4 - <i>Determinação da análise de regressão das rectas de calibração</i> .....	60
2.4.1 - Método – ABTS.....	62
2.4.2 - Método – DPPH .....	64
2.5 – <i>Estudos de RMN</i> .....	65

## **2 - Parte Experimental**

### **2.1 – Fraccionamento de vinho branco**

Desenvolveu-se uma técnica de fraccionamento prévio de vinho branco por extracção líquido-líquido. Os extractos foram obtidos por fraccionamento sequencial de vinho usando hexano, acetato de etilo e acetona como solventes. A **Figura 30** resume o esquema sequencial das extracções efectuadas a 250 mL de vinho ajustado a pH 1.



Legenda:

AAR – Actividade anti-radicalar

RMN – Ressonância magnética nuclear

Extracto\_1 – hexano

Extracto\_2 – acetato de etilo / hexano

Extracto\_3 – acetato de etilo / acetona

\* Nem sempre foram realizadas.

Figura 30 – Esquema sequencial das extracções e análises efectuadas ao vinho branco.

O pH de 750 mL de vinho branco foi ajustado para valores próximos de 1, com uma solução de HCl 2 M. Num balão de fundo redondo de 500 mL foram introduzidos 250 mL desta solução e adicionados 100 mL de hexano. Esta mistura foi agitada durante 30 minutos sob azoto e protegida da luz. Ao fim dos 30 minutos, a mistura foi decantada num balão de decantação de 1 litro sendo recuperada a fracção orgânica. A extracção foi repetida mais duas vezes com 50 mL de hexano durante 30 minutos. O extracto final, obtido a partir das três extracções, foi concentrado até à secura em evaporador rotativo a baixa temperatura. À restante fracção aquosa foram adicionados 100 mL de acetato de etilo. Esta mistura foi, à semelhança da extracção com hexano, agitada durante 30 minutos sob azoto e decantada sendo recuperada a fracção orgânica. A

extracção foi repetida mais duas vezes com 50 mL de acetato de etilo, durante 30 minutos, sendo o extracto final evaporado até à secura num evaporador rotativo.

O procedimento anterior, fraccionamento sequencial do vinho usando hexano e acetato de etilo, foi repetido mais duas vezes até à extracção completa dos 750 mL de vinho inicial. Os extractos foram posteriormente secos sob vácuo obtendo-se dois resíduos. O último resíduo, extraído com acetato de etilo, foi sujeito a fraccionamento com hexano e acetona. À semelhança das extracções anteriores o resíduo seco de acetato de etilo foi extraído, sequencialmente, duas vezes com 50 mL de hexano e duas vezes com 50 mL de acetona. Os extractos finais foram concentrados em evaporador rotativo e posteriormente secos sob vácuo.

No final do procedimento obtivemos três extractos finais: Extracto\_1: hexano; Extracto\_2: acetato de etilo/ hexano; e Extracto\_3: acetato de etilo/acetona. Todos os extractos secos foram dissolvidos numa solução a 50 % em etanol, solvente utilizado para dissolver eficazmente e da mesma maneira todos os extractos (apolares e polares), a uma concentração de 3 mg/mL (concentração óptima encontrada para uma eficaz interpolação nas rectas de calibração dos métodos utilizados na avaliação da actividade antioxidante).

Estes extractos foram sujeitos a análise para avaliar a actividade anti-radicalar dos mesmos. Nos extractos em que a actividade anti-radicalar foi mais relevante procedeu-se igualmente à sua análise por RMN.

O vinho branco utilizado neste fraccionamento foi um vinho de várias castas da região Demarcada do Douro, sendo 2004 o seu ano de colheita.

## 2.2 - Protocolo de envelhecimento forçado de vinho branco

Foi realizado um protocolo de envelhecimento forçado de vinho branco (vinho sujeito à temperatura de 60 °C) onde se procedeu à adição de oxigénio e dióxido de enxofre para tentar avaliar, em cada um dos casos, as suas contribuições para a resistência à oxidação. A **Figura 31** resume o esquema do referido protocolo. Seis litros de vinho branco foram divididos em três partes iguais (2 litros). A primeira parte corresponde ao vinho testemunho, isento de

adições ou alterações, a segunda parte corresponde ao vinho saturado com oxigénio, por contacto com o ar e agitação, e a terceira parte corresponde ao vinho com adição de SO<sub>2</sub> na forma de metabissulfito de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Cada uma das três partes foi dividida em dois ficando uma parte sujeita à temperatura ambiente (20 °C) e a outra parte sujeita à temperatura de 60 °C. O protocolo teve a duração de 21 dias. O vinho sujeito a saturação com oxigénio foi ressaturado ao 3º, 7º e 14º dias. Estas saturações foram sempre realizadas com agitação, num agitador magnético, até valores de oxigénio dissolvido próximos de 7 mg/L, para ambas as temperaturas (20 °C e 60 °C).

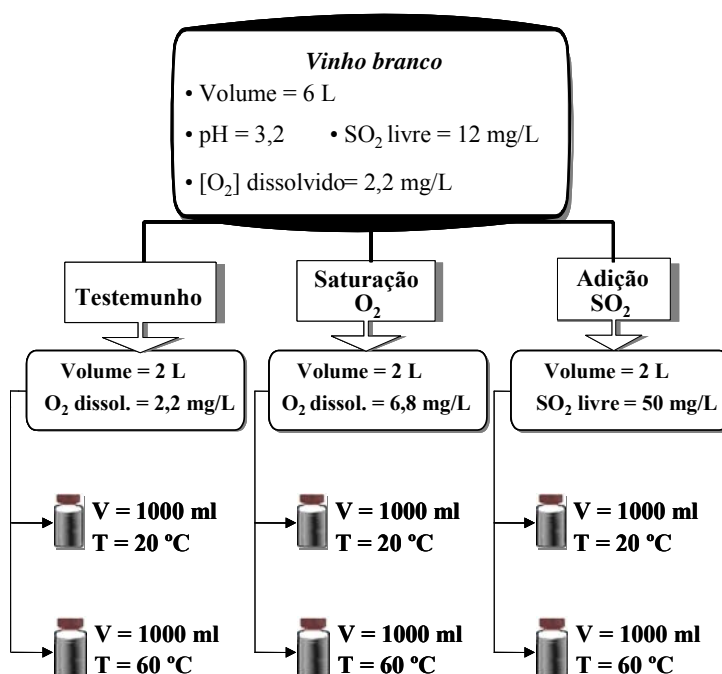


Figura 31 – Esquema do protocolo de envelhecimento forçado de vinho branco.

O oxigénio dissolvido foi medido com uma sonda de oxigénio da YSI, modelo 5000, e o de SO<sub>2</sub> foi analisado através da norma portuguesa para a determinação de dióxido de enxofre (NP 2220 de 1987). Após os 21 dias de protocolo os vinhos foram sujeitos ao fraccionamento descrito anteriormente no ponto 2.1.

O vinho branco utilizado neste fraccionamento foi um vinho de várias castas da região Demarcada do Alentejo, sendo 2004 o seu ano de colheita.

### **2.3 - Métodos utilizados para avaliar a actividade antioxidante**



### 2.3.1 - Método – ABTS

A actividade antioxidante dos extractos de vinho branco foi determinada segundo o procedimento descrito por Re *et al.* (1999). A alíquotas de 20 µL de extracto, dissolvido em etanol a 50 %, ou vinho foram adicionados 2 mL de solução de ABTS<sup>•+</sup>. O ABTS foi dissolvido em água ultra-pura a uma concentração de 7 mM. O radical ABTS<sup>•+</sup> foi formado a partir da reacção da solução de ABTS (7 mM) com uma solução de persulfato de potássio a 2,45 mM em água ultra-pura. A reacção é efectuada misturando as duas soluções na estequiometria de 1:1 à temperatura ambiente e no escuro durante 16 horas. Foi utilizado o ácido ascórbico como padrão de antioxidante. Foram feitos ensaios cinéticos com os extractos de vinho branco (**Figura 32**) para determinar o tempo óptimo de reacção dos mesmos. As experiências foram efectuadas a 30 °C. As medidas foram realizadas a 734 nm, sendo a absorvância inicial ajustada a 0,70 (+/- 0,2), contra um branco contendo água ultra-pura. O controlo foi efectuado com 20 µL de água destilada e 2 mL de ABTS<sup>•+</sup>. As análises foram feitas em triplicado. A percentagem de inibição na reacção para cada tempo (T) foi calculada a partir da fórmula:

$$\text{Percentagem de inibição (Q)} = 100 * ([A_{734}]_{T0} - [A_{734}]_T) / [A_{734}]_{T0}$$

onde:

$[A_{734}]_T$  é a absorvância no tempo experimental T

$[A_{734}]_{T0}$  é a absorvância do controlo no tempo T0

Em alguns casos (extractos de hexano e acetato de etilo/hexano) foi necessário aumentar o volume de amostra de 20 µL para 100 µL uma vez que a percentagem de inibição deve ser superior a 20 % (Re *et al.*, 1999).

A partir da interpretação da **Figura 32** foi possível obter um tempo óptimo de reacção de 30 minutos. Todos os extractos de vinhos obtidos a partir do fraccionamento acima descrito foram deixados a reagir durante 30 minutos efectuando-se leituras espectrofotométricas de minuto a minuto.

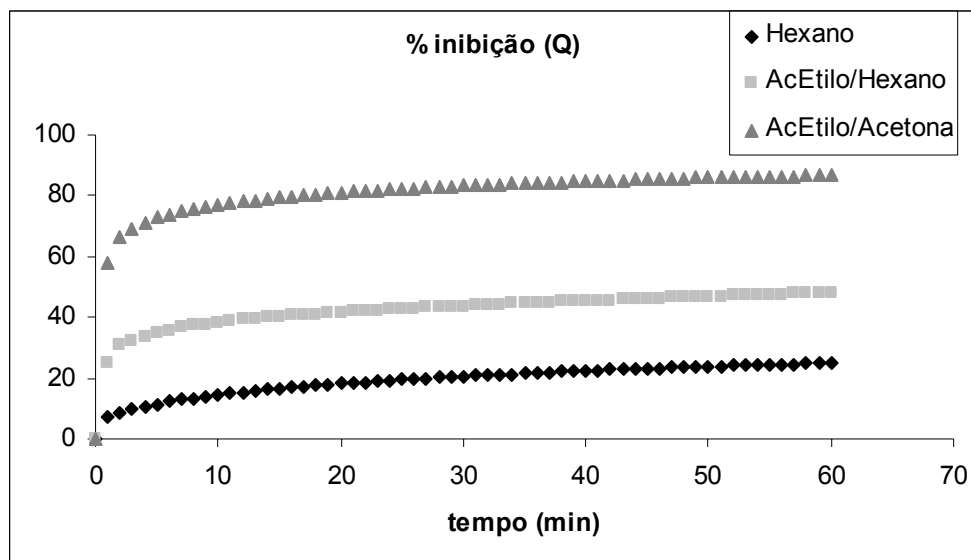


Figura 32 – Ensaio cinéticos com os extractos de vinho branco expressos em % de inibição do radical  $ABTS^{\bullet+}$ .

Legenda: Hexano – extractos de hexano

AcEtilo/Hexano – extractos de acetato de etilo reextraídos com hexano

AcEtilo/Acetona – extractos de acetato de etilo reextraídos com acetona

### 2.3.2 - Método – DPPH

A actividade antioxidante dos extractos de vinho branco foi determinada segundo o procedimento descrito por Brand-Williams *et al.* (1995). A alíquotas de 50 µL de extracto, dissolvido em etanol a 50 %, ou vinho foram adicionados 2 mL de solução de DPPH<sup>•</sup> (0.025 g/L em metanol). Foi utilizado o ácido ascórbico como padrão de antioxidante. Foram feitos ensaios cinéticos com os extractos de vinho branco (**Figura 33 e Figura 34**) para determinar o tempo óptimo de reacção dos mesmos. As experiências foram efectuadas a 20 °C. As medidas foram realizadas a 515 nm contra um branco contendo metanol. O controlo foi efectuado com 50 µL de água destilada e 2 mL da solução de DPPH<sup>•</sup>. As análises foram feitas em triplicado. A percentagem de DPPH<sup>•</sup> “residual” e a percentagem de inibição (Q) na reacção para cada tempo (T) foi calculada a partir das fórmulas:

$$\text{Percentagem de DPPH}^{\bullet} \text{ “residual”} = 100 * [A_{515}]_T / [A_{515}]_{T0}$$

$$\text{Percentagem de inibição (Q)} = 100 * ([A_{515}]_{T0} - [A_{515}]_T) / [A_{515}]_{T0}$$

onde:

$[A_{515}]_T$  é a absorvância no tempo experimental T

$[A_{515}]_{T0}$  é a absorvância do controlo no tempo T0

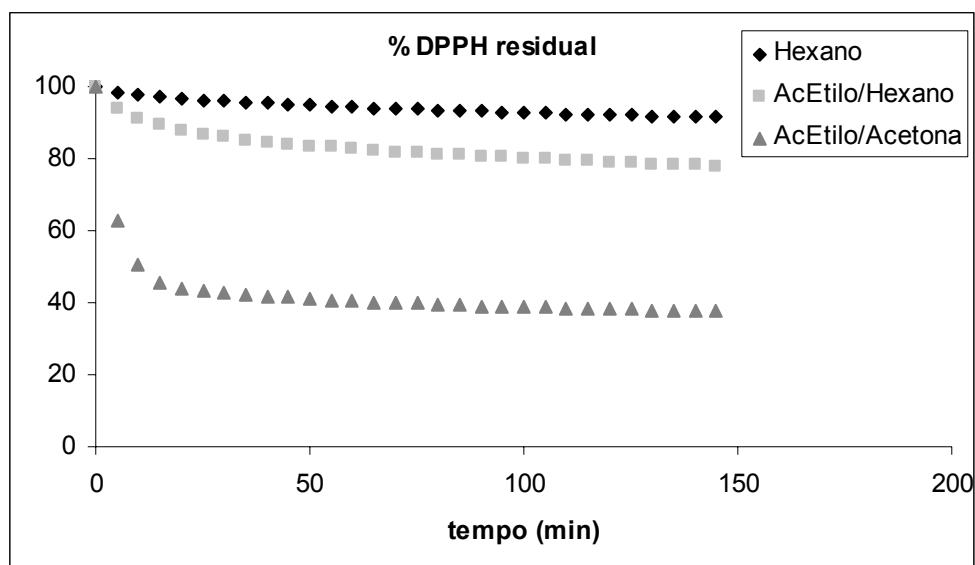


Figura 33 – Ensaio cinéticos com os extractos de vinho branco expressos em % de DPPH<sup>•</sup> “residual”.

Legenda: Hexano – extractos de hexano

AcEtilo/Hexano – extractos de acetato de etilo reextraídos com hexano

AcEtilo/Acetona – extractos de acetato de etilo reextraídos com acetona

A partir da interpretação da **Figura 33** e **Figura 34** foi possível obter um tempo óptimo de reacção de 100 minutos. Todos os extractos de vinhos obtidos a partir do fraccionamento descrito anteriormente no ponto 2.1 foram deixados a reagir durante 100 minutos efectuando-se leituras espectrofotométricas de 5 em 5 minutos.

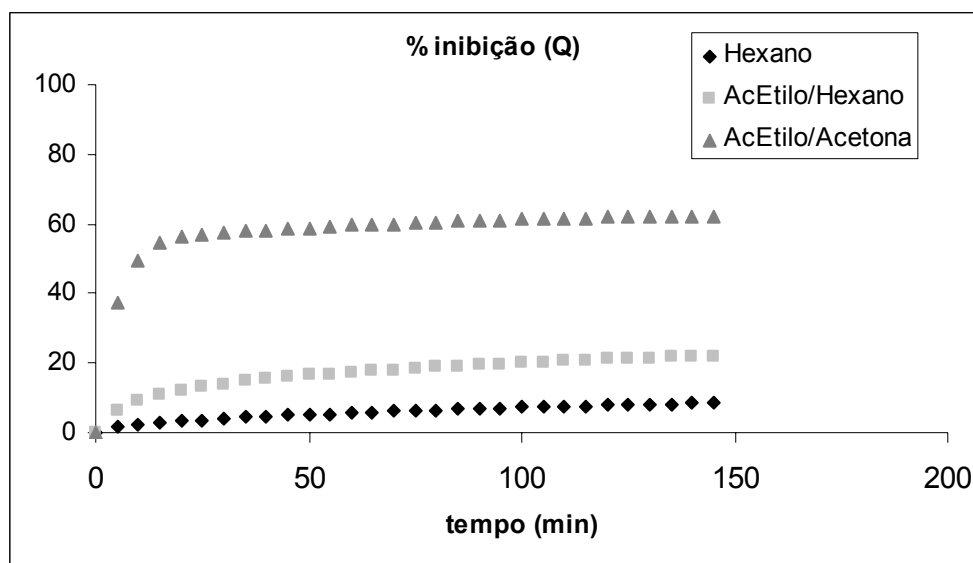


Figura 34 – Ensaio cinético com os extractos de vinho branco expressos em % de inibição do radical DPPH<sup>•</sup>.

Legenda: Hexano – extractos de hexano

AcEtilo/Hexano – extractos de acetato de etilo reextraídos com hexano

AcEtilo/Acetona – extractos de acetato de etilo reextraídos com acetona

## 2.4 - Determinação da análise de regressão das rectas de calibração

As equações das rectas foram obtidas pelo método dos mínimos quadrados estando os parâmetros e as expressões utilizadas representadas nas seguintes equações:

$$\text{Equação 1: declive} - a = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$\text{Equação 2: ordenada na origem} - b = \bar{y} - a\bar{x}$$

$$\text{Equação 3: coeficiente de correlação} - r = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{[\sum_i (x_i - \bar{x})^2][\sum_i (y_i - \bar{y})^2]}}$$

$$\text{Equação 4: desvio padrão da ordenada na origem} - sb = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

$$\text{Equação 5: desvio padrão do declive} - sa = \frac{s_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

A quantidade mínima que é possível detectar pelo método, ou seja, a concentração para a qual o sinal obtido é significativamente diferente do branco,

corresponde ao limite de detecção e pode ser calculado para o método da curva de calibração pela seguinte expressão:

$$\text{L.D.D.} = \frac{3s_b - b}{a}$$

O limite de quantificação corresponde à concentração mínima para a qual a medida tem significado quantitativo, e para o método da curva de calibração, é normalmente calculado pela seguinte expressão:

$$\text{L.D.Q.} = \frac{10s_b - b}{a}$$

### 2.4.1 - Método – ABTS

Volume utilizado = 20 µL de extracto ou vinho branco

Percentagem de inibição em função da concentração de ácido ascórbico:

$$Y = aX + b$$

**Y = Percentagem de inibição**

**X = Concentração de ácido ascórbico em mg/L**

a	b	r
2,33E-01	-9,15E+00	9,962E-01

X	Y
110,7	15,01
166,0	28,77
221,3	42,46
276,6	57,94
332,0	71,36
442,6	90,89

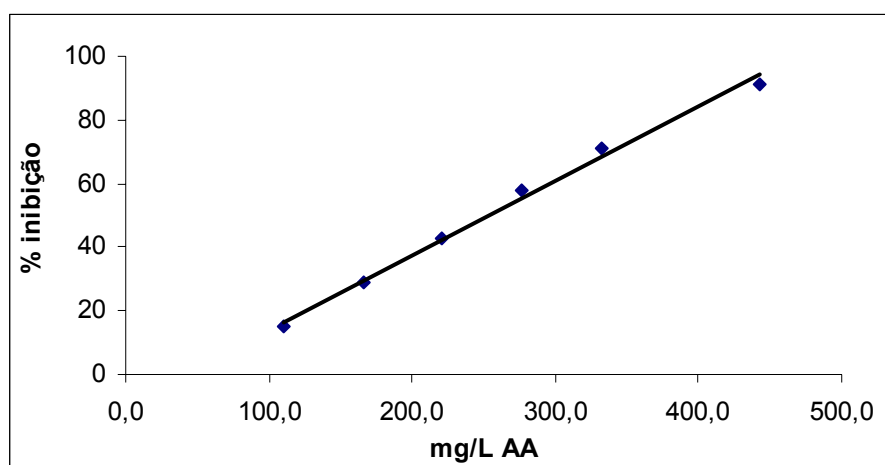




Figura 35 – Curva de calibração de ácido ascórbico para um volume utilizado de 20 µL de extracto.

**L.D.D.** (limite de detecção) = 36,74 mg/L de equivalentes de AA

**L.D.Q.** (limite de quantificação) = 122,48 mg/L de equivalentes de AA

Volume utilizado = 100 µL de extracto

a	b	r
9,00E-01	-1,07E+00	9,984E-01

X	Y
5,5	4,33
11,0	8,76
22,0	19,71
44,0	37,69
66,0	55,61
88,0	80,31

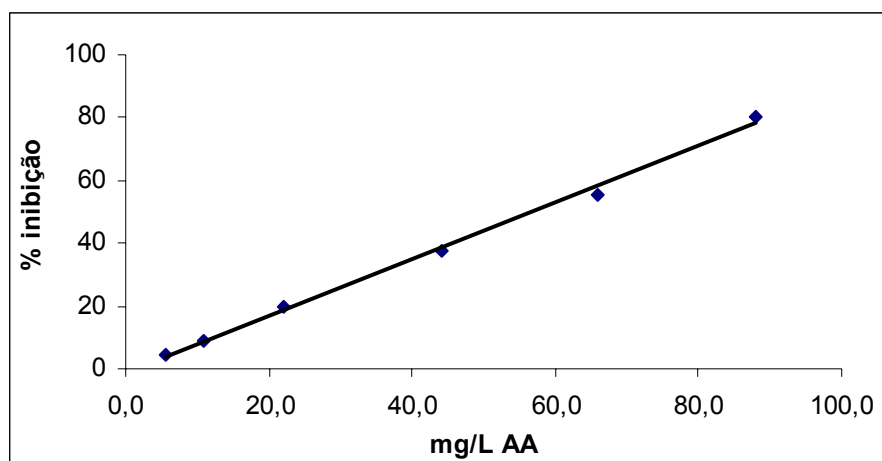


Figura 36 – Curva de calibração de ácido ascórbico para um volume utilizado de 100 µL de extracto.

**L.D.D.** (limite de detecção) = 4,22 mg/L de equivalentes de AA

**L.D.Q.** (limite de quantificação) = 14,06 mg/L de equivalentes de AA

### 2.4.2 - Método – DPPH

Volume utilizado = 50 µL de extracto ou vinho branco

Percentagem de inibição em função da concentração de ácido ascórbico:

$$Y = aX + b$$

**Y = Percentagem de inibição**

**X = Concentração de ácido ascórbico em mg/L**

<b>a</b>	<b>b</b>	<b>r</b>
4,07E-01	8,57E-01	9,999E-01

<b>X</b>	<b>Y</b>
11,5	5,44
23,0	10,19
46,0	20,06
92,0	37,71
115,0	47,57
172,5	71,18

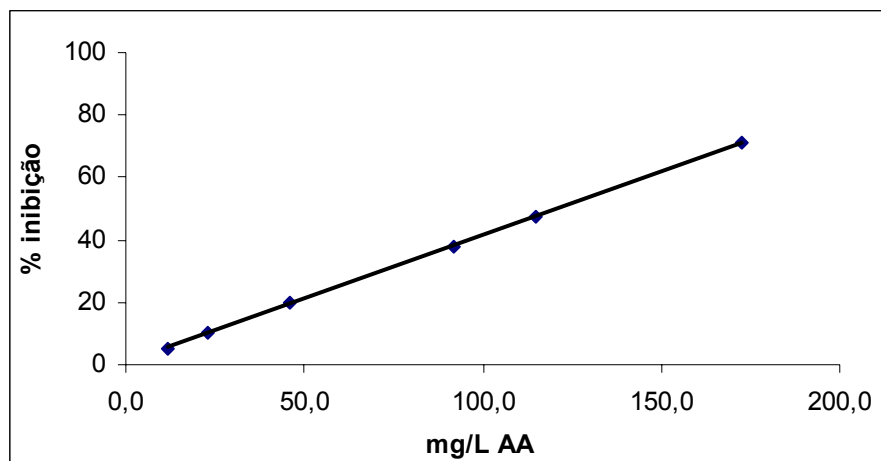


Figura 37 – Curva de calibração de ácido ascórbico para um volume utilizado de 50  $\mu$ L de extracto.

**L.D.D.** (limite de detecção) = 1,98 mg/L de equivalentes de AA

**L.D.Q.** (limite de quantificação) = 6,59 mg/L de equivalentes de AA

## 2.5 – Estudos de RMN

Os espectros e RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  relativos aos extractos orgânicos de vinho foram efectuados em dimetilsulfóxido deuterado. O extracto aquoso relativo ao vinho testemunho do protocolo de envelhecimento forçado foi efectuado em água deuterada. Todos os extractos foram obtidos num espectrómetro Bruker Avance 500, operando a 500,13 MHz para  $^1\text{H}$  e 125,66 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Os desvios químicos estão expressos em  $\delta$  (ppm) relativamente a uma referência de TMS.

As atribuições de RMN de  $^1\text{H}$  foram efectuados com auxílio de espectros de RMN bidimensional de correlação espectroscópica homonuclear (COSY) e os de RMN de  $^{13}\text{C}$  foram efectuados com base nos espectros de RMN bidimensional de correlação espectroscópica heteronuclear a uma ligação [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ; HSQC;

$^1\text{J}(\text{CH})$ ] otimizada para 149 Hz e a longa distância para 7 Hz [ $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ; HMBC;  $^2\text{J}(\text{CH})$  e  $^3\text{J}(\text{CH})$ ].

### **Capítulo 3 – *Extracção de diferentes tipos de vinho com solventes orgânicos e avaliação da actividade antioxidante das fracções obtidas***

3 - Resultados e Discussão.....	67
3.1 – Resultados obtidos na extracção de vinho branco .....	67
3.2 - Resultados obtidos na extracção de alguns compostos de reconhecida actividade antioxidante .....	70
3.3 - Resultados obtidos na extracção de vinhos brancos com diferentes idades .....	72
3.4 - Resultados obtidos na extracção de vinhos brancos de envelhecimento forçado.....	76
3.4.1 - Comparação do efeito da temperatura.....	77
3.4.1.1 – Fracção hexano (Extractos_1) .....	77

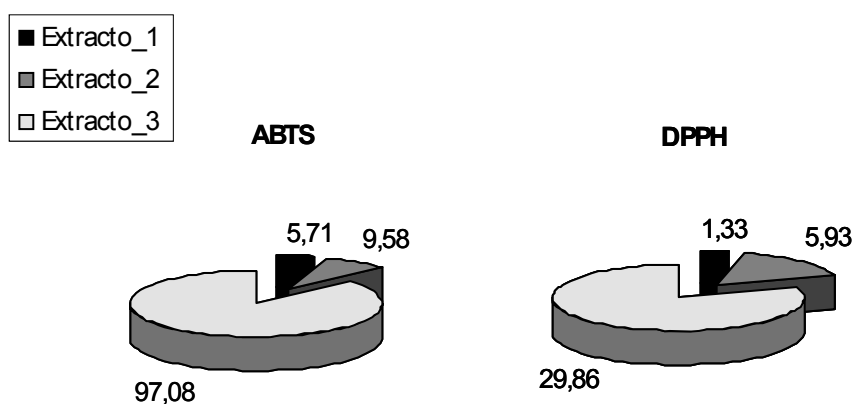
3.4.1.2 - <i>Fracção acetato de etilo/hexano (Extractos_2)</i> .....	80
3.4.1.3 - <i>Fracção acetato de etilo/acetona (Extractos_3)</i> .....	83
3.4.2 – <i>Comparação do efeito oxigénio</i> .....	86
3.4.2.1 - <i>Fracção acetato de etilo/acetona (Extractos_3)</i> .....	86
3.4.3 - <i>Resultados obtidos nos vinhos brancos sujeitos ao protocolo de envelhecimento forçado não sujeitos a extracção</i> .....	88
3.4.3.1 - <i>Análises complementares efectuadas aos vinhos brancos sujeitos ao protocolo de envelhecimento forçado</i> .....	92
3.4.3.2 - <i>Comparação da actividade antioxidante dos vinhos brancos analisados com as respectivas fracções extraídas com os diferentes solventes</i> .....	94
3.4.4 - <i>Espectros de RMN de <sup>1</sup>H</i> .....	96
3.4.5 - <i>Espectros de RMN de <sup>13</sup>C</i> .....	102
3.4.6 - <i>Espectros de RMN bidimensional</i> .....	105
3.4.7 – <i>Ampliação da zona aromática dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H do extracto orgânico de AcEtilo/Acetona e da fracção aquosa do vinho branco testemunho</i> .....	106
3.5 - <i>Resultados obtidos na extracção de vinhos do Porto tinto novo e velho</i>	110

### 3 - Resultados e Discussão

#### 3.1 – Resultados obtidos na extracção de vinho branco

A técnica de fraccionamento desenvolvida na secção 2.1 da Parte Experimental foi aplicada a um vinho branco. Os extractos obtidos, Extracto\_1, Extracto\_2 e Extracto\_3 (**Figura 38**) foram sujeitos a avaliação com o objectivo de determinar a actividade antioxidante, pelos métodos descritos na secção 2.3 da Parte Experimental. Os resultados estão expressos na **Figura 38**.

### Actividade Antioxidante (miligramas de ácido ascórbico por grama de extracto)



Legenda:

Extracto\_1 – hexano

Extracto\_2 – acetato de etilo / hexano

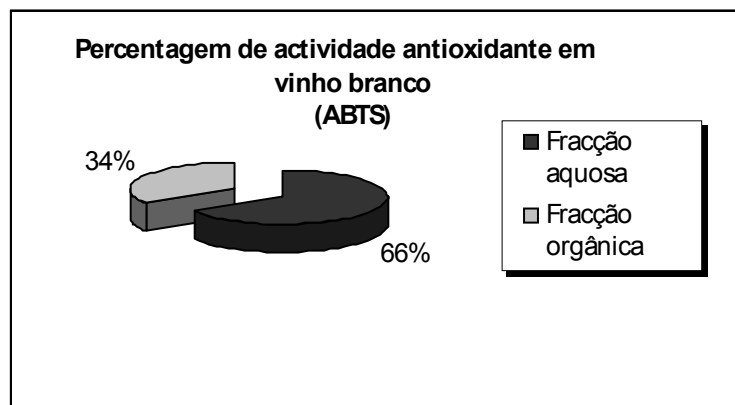
Extracto\_3 – acetato de etilo / acetona

Figura 38 – Actividade antioxidante de extractos de vinho branco.

A actividade antioxidante foi avaliada pelos métodos do ABTS e do DPPH descritos na secção 2.3 da Parte Experimental. Estes métodos, apesar de serem correlacionáveis, apresentam valores absolutos diferentes sendo os valores obtidos a partir do método do ABTS cerca de três vezes superiores aos valores obtidos com o método do DPPH. Resultados similares, embora menos expressivos, foram obtidos em vinhos brancos da África do Sul (Dalene De Beer *et al.*, 2003), onde os valores obtidos a partir do método do ABTS são cerca de 1,4 vezes superiores aos valores obtidos a partir do método do DPPH.

Foram também observadas diferenças entre os extractos analisados. A actividade antioxidante dos extractos extraídos com acetato de etilo e reextraídos com acetona (Extractos\_3) é maior do que a encontrada para os restantes extractos, apresentando valores cerca de 95 % acima dos valores encontrados para os extractos extraídos com hexano (Extractos\_1). Este resultado está de acordo com o esperado uma vez que os compostos fenólicos (polares), com reconhecida actividade antioxidante, poder-se-ão encontrar nos extractos mais polares (Extractos\_3).

Os extractos obtidos através desta técnica de fraccionamento constituem a fracção orgânica do vinho branco. Os restos de vinho, obtidos após o fraccionamento, constituem a fracção aquosa do mesmo. Numa tentativa de saber qual a percentagem de compostos com actividade antioxidante extraídos com este método foi avaliada, à semelhança dos extractos de vinho branco, a actividade antioxidante da fracção aquosa do vinho. Desta avaliação, para este sistema de extracção, concluiu-se que apenas cerca de 34 % de compostos com actividade antioxidante são extraídos com o método desenvolvido (fracção orgânica) e a fracção aquosa representa os restantes 66 % de compostos com actividade antioxidante. Esta percentagem pode variar dependendo do solvente de extracção e das características do vinho. A **Figura 39** traduz a percentagem de actividade antioxidante no vinho branco analisado, avaliada pelo método do ABTS.



Legenda:

Fracção aquosa: Restos de vinho após o fraccionamento

Fracção orgânica: Extracto\_1 + Extracto\_2 + Extracto\_3

Figura 39 – Percentagem de actividade antioxidante distribuída pelas fracções aquosa e orgânica.

### 3.2 - Resultados obtidos na extracção de alguns compostos de reconhecida actividade antioxidante

Com o objectivo de saber qual o tipo de compostos extraídos com o método desenvolvido neste trabalho, foram extraídas soluções aquosas de ácido ascórbico, catequina, ácido gálico e SO<sub>2</sub> de concentrações aproximadamente a 250 mg por litro.

% actividade antioxidante	AA	Cat	AG	SO <sub>2</sub>
Fracção aquosa	99,0	26,1	38,3	99,8
Hexano	0,3	0,1	0,0	0,1
AcEtilo/Hexano	0,2	0,1	3,7	0,1
AcEtilo/Acetona	0,5	73,7	58,0	0,0
Total	100,0	100,0	100,0	100,0

Tabela11 – Percentagem de actividade antioxidante nas diferentes fracções do vinho.



AA – ácido ascórbico; Cat – catequina; AG – ácido gálico; SO<sub>2</sub> – dióxido de enxofre

Da análise da **Tabela 11** é possível concluir que o ácido ascórbico e o dióxido de enxofre não são extraídos no método utilizado neste trabalho ficando respectivamente 99,0 % e 99,8 % na fracção aquosa do vinho branco. Os compostos fenólicos testados, catequina e ácido gálico, são extraídos respectivamente 73,9 % e 61,7 % utilizando o método desenvolvido.

O método de fraccionamento de vinho desenvolvido neste trabalho não extrai dois dos reconhecidos compostos antioxidantes presentes no vinho, o ácido ascórbico e o dióxido de enxofre. No entanto, outras moléculas com poder antioxidante, menos conhecidas e/ou desconhecidas, e neste sentido com interesse no seu estudo, estão contidas nos extractos orgânicos obtidos após o fraccionamento do vinho representando cerca de 34 % do total de compostos com actividade antioxidante.

### 3.3 - Resultados obtidos na extracção de vinhos brancos com diferentes idades

Nesta parte do trabalho foram analisados 6 vinhos brancos distintos de diferentes idades. A cada um dos vinhos foi aplicado o processo de fraccionamento desenvolvido na secção 2.1 da Parte Experimental. A **Figura 40** representa a actividade antioxidante total dos vinhos distribuída pela fracção orgânica extraída (F\_orgânica), que constitui a soma do Extracto\_1, Extracto\_2 e Extracto\_3, e pela fracção aquosa (F\_aquosa), que constitui os restos de vinho após o fraccionamento, em miligramas de ácido ascórbico por litro de vinho.

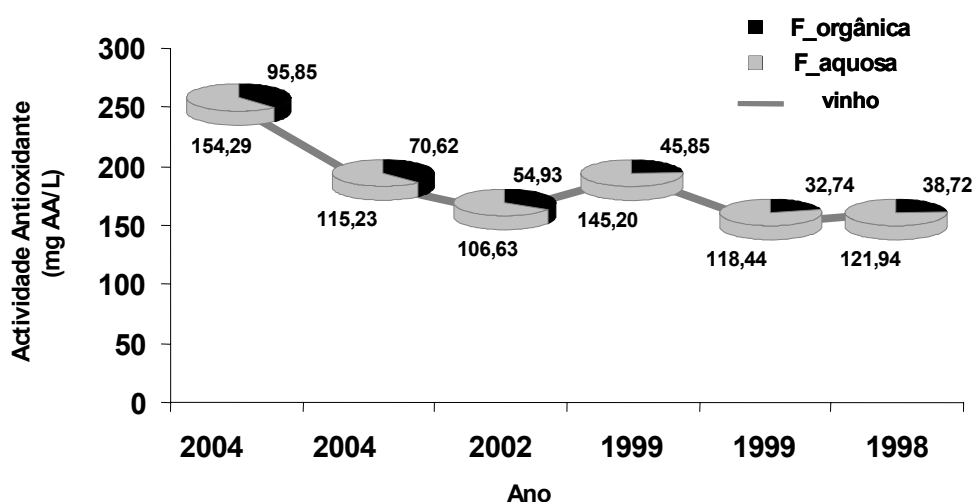


Figura 40 – Actividade antioxidante total dos vinhos distribuída pela fracção orgânica (F\_orgânica) e pela fracção aquosa (F\_aquosa).

Da análise da **Figura 40** é possível observar que à medida que o vinho vai envelhecendo a actividade antioxidante total dos vinhos diminui. Esta diminuição poder-se-ia dever ao consumo em antioxidantes como o dióxido de enxofre e o ácido ascórbico contidos na fracção aquosa (secção 3.2 deste capítulo), uma vez que os vinhos novos apresentam uma maior concentração nestes compostos. Os vinhos novos, com 1 ou 2 anos de idade, têm cerca de 50 mg/L de dióxido de enxofre na forma livre. Esta quantidade será rapidamente consumida ao fim deste tempo onde o dióxido de enxofre passa a estar na forma combinada e, assim, não disponível. O ácido ascórbico não é normalmente adicionado em vinhos Europeus pelo que, a menos que seja adicionado, existe em quantidades vestigiais no fim da fermentação e no vinho final. No entanto, devido ao aumento da actividade antioxidante na fracção aquosa, **Figura 40**, esta diminuição natural em dióxido de enxofre e ácido ascórbico poderá ser compensada pela formação de novos compostos com possível poder antioxidante.

Por outro lado, a fracção orgânica, constituída pelos compostos extraídos com os solventes utilizados neste trabalho diminui, reflectindo a mesma tendência dos vinhos analisados. Apesar dos poucos vinhos estudados, podemos dizer que a fracção orgânica, apesar de apresentar uma actividade antioxidante inferior à fracção aquosa, parece conter os compostos que são preferencialmente consumidos ao longo do tempo constituindo assim a primeira linha de defesa do vinho à resistência à oxidação e, neste sentido, com interesse no seu estudo.

Numa tentativa de conhecer as espécies envolvidas na protecção ao oxigénio, nestes vinhos, foram analisados os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extractos de AcEtilo/Acetona dos vinhos com 1 ano de idade, que apresenta valores de actividade antioxidante de 95,85 mg AA/L, e com 7 anos de idade, que apresenta valores de actividade antioxidante de 38,72 mg AA/L correspondendo assim aos limites de idade estudados nesta parte do trabalho (**Figura 41**).

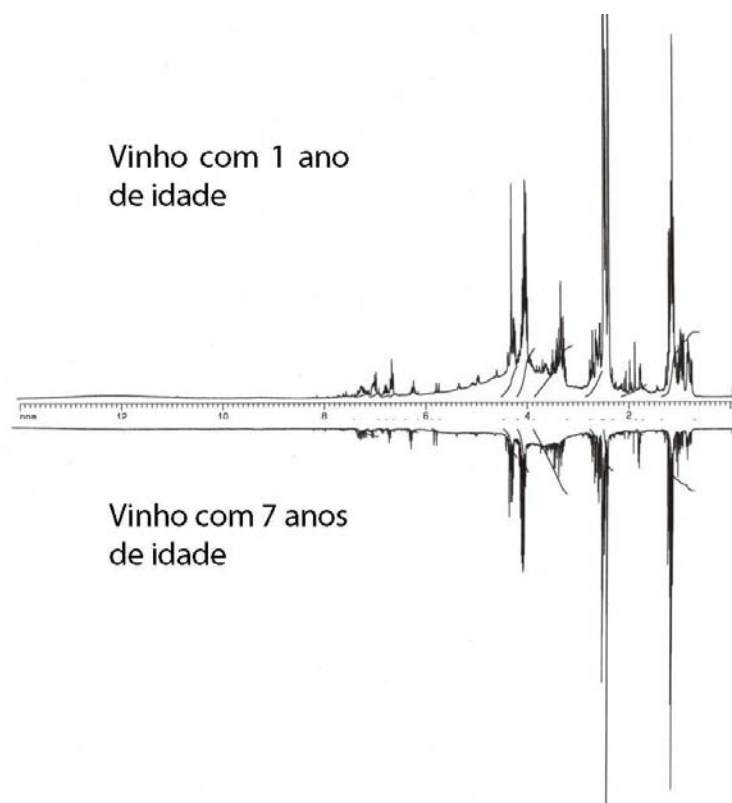


Figura 41 – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extractos de AcEtilo/Acetona dos vinhos brancos com 1 e 7 anos de idade.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da **Figura 41** apresentam perfis idênticos. No entanto, uma análise quantitativa baseada nos integrais das zonas com expressão espectral (Zona1: de 8 a 6 ppm; Zona 2: de 4,5 a 3 ppm; Zona 3: de 2 a 1 ppm) foi realizada (**Tabela 12**).

Zona espectral (ppm)	8 a 6	4,5 a 3	2 a 1
Vinho com 1 ano de idade	1	7,33	4,30
Vinho com 7 anos de idade	1	9,89	4,31

Tabela 12 – Integrais dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extractos de AcEtilo/Acetona dos vinhos com 1 e 7 anos de idade.

Comparando os integrais das diferentes zonas indicadas na **Tabela 12** é possível verificar que a zona espectral correspondente aos compostos da zona

aromática (6 a 8 ppm) está normalizada. No entanto, como os integrais das diferentes zonas são similares, pode-se afirmar que os vinhos apresentam quantidades aproximadas de compostos fenólicos.

A fracção aquosa, apesar de apresentar uma actividade antioxidante superior à fracção orgânica não foi sujeita a análise por RMN, nestes vinhos, devido à limitação do solvente empregado (água). Para uma possível análise de RMN teríamos que evaporar toda a água das fracções aquosas dos vinhos, a baixa temperatura, o que se tornaria num processo difícil e moroso e que poderia oxidar os compostos existentes nestas fracções.

### **3.4 - Resultados obtidos na extracção de vinhos brancos de envelhecimento forçado**

Numa tentativa de conhecer a natureza dos mecanismos e das espécies envolvidas na protecção ao oxigénio foi realizado um protocolo de envelhecimento forçado de vinho branco descrito na secção 2.2 da Parte Experimental, onde se procedeu à adição de oxigénio e dióxido de enxofre para tentar avaliar, em cada um dos casos, as suas contribuições para a resistência à oxidação. Os vinhos foram sujeitos à temperatura de 20 °C e 60 °C durante 21 dias. A técnica de fraccionamento desenvolvida na secção 2.1 da Parte Experimental foi aplicada ao respectivo protocolo, sendo a actividade antioxidante avaliada pelos métodos do ABTS e do DPPH descritos na secção 2.3 da Parte Experimental.

### 3.4.1 - Comparação do efeito da temperatura

#### 3.4.1.1 – Fracção hexano (*Extractos\_1*)

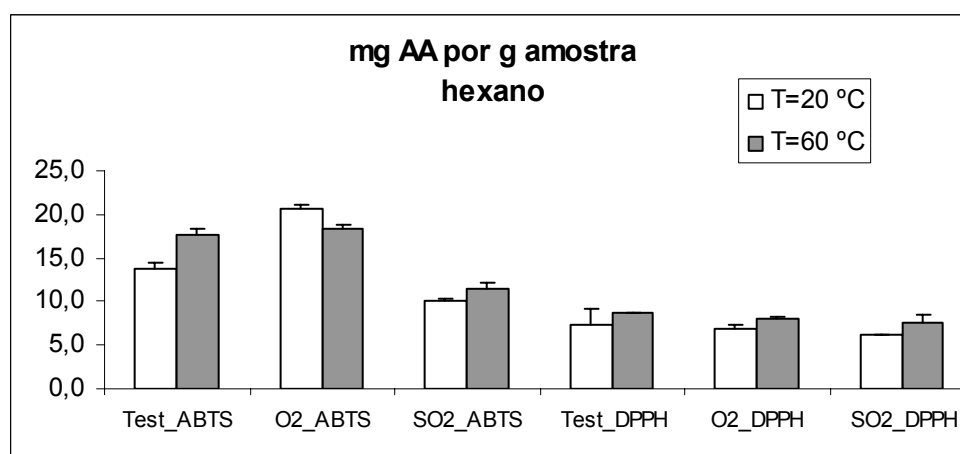


Figura 42 – Comparação do efeito da temperatura na actividade antioxidante das fracções extraídas com hexano.

A actividade antioxidante está expressa em quantidade (miligramas) de ácido ascórbico por quantidade (gramas) de extracto.

**Test:** Vinho branco controlo.

**O<sub>2</sub>:** Vinho branco sujeito a quatro saturações com oxigénio.

**SO<sub>2</sub>:** Vinho branco suplementado com dióxido de enxofre (50 mg/L na forma livre).

### Análise estatística dos extractos de hexano de vinho branco

		<b>ABTS</b>			<b>DPPH</b>		
		<i>Testemunho</i>	<i>O<sub>2</sub></i>	<i>SO<sub>2</sub></i>	<i>Testemunho</i>	<i>O<sub>2</sub></i>	<i>SO<sub>2</sub></i>
Hexano 20	<i>Média</i>	13,8	20,6	10,0	7,4	6,8	6,1
	<i>N</i>	3	3	3	3	3	3
	<i>Desvio Padrão</i>	0,7	0,4	0,4	1,7	0,5	0,1
Hexano 60	<i>Média</i>	17,6	18,3	11,5	8,6	7,9	7,6
	<i>N</i>	3	3	3	3	3	3
	<i>Desvio Padrão</i>	0,7	0,5	0,6	0,1	0,4	0,9

Tabela 13 – Médias e desvios padrão do efeito da temperatura para os extractos de hexano de vinho branco.

Hexano	ANOVA	Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	F	Sg.	Conclusão
<b>Test_ABTS</b>	Entre Grupos	22,5	1	22,5	45,5	<b>0,003</b>	<b>Há diferenças</b>
	Dentro Grupos	2,0	4	0,5			
	Total	24,5	5				
<b>O<sub>2</sub>_ABTS</b>	Entre Grupos	8,4	1	8,4	40,9	<b>0,003</b>	<b>Há diferenças</b>
	Dentro Grupos	0,8	4	0,2			
	Total	9,2	5				
<b>SO<sub>2</sub>_ABTS</b>	Entre Grupos	3,3	1	3,3	11,3	<b>0,028</b>	<b>Há diferenças</b>
	Dentro Grupos	1,2	4	0,3			
	Total	4,5	5				
<b>Test_DPPH</b>	Entre Grupos	2,3	1	2,3	1,6	0,270	Não há diferenças
	Dentro Grupos	5,6	4	1,4			
	Total	7,9	5				
<b>O<sub>2</sub>_DPPH</b>	Entre Grupos	1,8	1	1,8	8,7	<b>0,042</b>	<b>Há diferenças</b>
	Dentro Grupos	0,8	4	0,2			
	Total	2,6	5				
<b>SO<sub>2</sub>_DPPH</b>	Entre Grupos	3,2	1	3,2	7,4	0,053	Não há diferenças
	Dentro Grupos	1,7	4	0,4			
	Total	4,9	5				

Tabela 14 – Anovas do efeito da temperatura para os extractos de hexano de vinho branco.



A capacidade antioxidante da fracção extraída com hexano (compostos apolares) parece aumentar com a temperatura. Este aumento verifica-se em todos os tratamentos (testemunho, O<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>), para ambos os métodos utilizados (ABTS e DPPH), à excepção dos extractos derivados do tratamento com oxigénio e avaliados pelo método do ABTS (O<sub>2</sub>\_ABTS). Esta observação não tem significância estatística, *Sig.* > 0,05 (**Tabela 14**) para os extractos avaliados a partir do método do DPPH respectivamente para o vinho branco testemunho e para o vinho branco com adição de dióxido de enxofre (Test\_DPPH e SO<sub>2</sub>\_DPPH). Nos extractos derivados do tratamento com oxigénio e avaliados pelo método do ABTS, os compostos sujeitos à temperatura de 60 °C e saturados com oxigénio têm cerca de menos 11,5 % da resistência à oxidação em relação aos compostos sujeitos a saturação com oxigénio mas mantidos a 20 °C (*Sig.* = 0,003). É de salientar, ainda, que o aumento da resistência à oxidação dos compostos sujeitos à temperatura de 60 °C no vinho testemunho é de cerca de 22,0 % em relação aos compostos do vinho mantido à temperatura de 20 °C (*Sig.* = 0,003).

O aumento da resistência à oxidação com o aumento da temperatura (60 °C) pode estar relacionado com a formação de produtos que se geram durante o aquecimento, como é o caso dos produtos da reacção de Maillard. A reacção de Maillard, nos alimentos, ocorre a temperaturas superiores a 50 °C e a um pH óptimo entre 4 e 7 (Morales *et al.*, 2001). Alguns autores (Manzocco *et al.*, 1999; Nicoli *et al.*, 1997; Anese *et al.*, 1998) reportaram que tratamentos de aquecimento prolongados podem promover a formação de compostos com actividade antioxidante. Manzocco *et al.* (1999) relatou que em vinho cozido, sujeito a tratamento por aquecimento, a formação de produtos da reacção de Maillard com propriedades antioxidantes pode contrabalançar a perda de compostos polifenólicos antioxidantes levando a um aumento da actividade antioxidante total.

#### 3.4.1.2 - Fracção acetato de etilo/hexano (Extractos\_2)

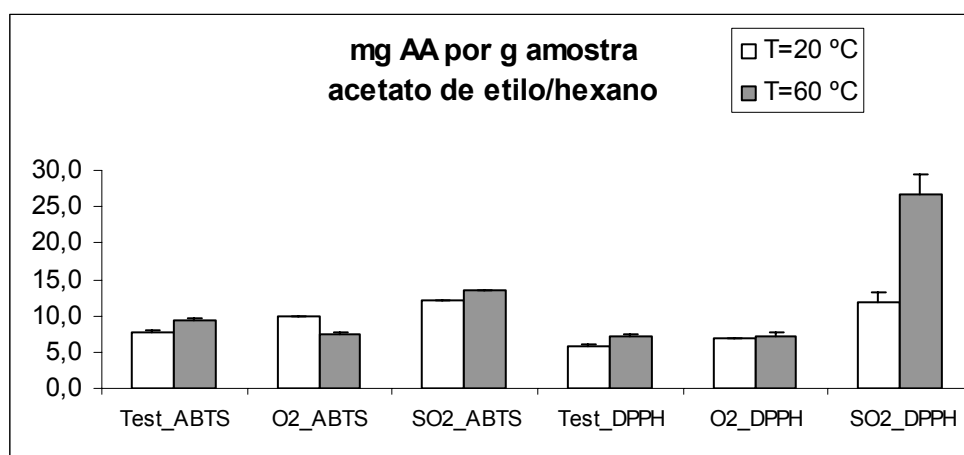


Figura 43 – Comparação do efeito da temperatura na actividade antioxidante das fracções extraídas com acetato de etilo e reextraídas com hexano.

A actividade antioxidante está expressa em quantidade (miligramas) de ácido ascórbico por quantidade (gramas) de extracto.

**Test:** Vinho branco controlo.

**O<sub>2</sub>:** Vinho branco sujeito a quatro saturações com oxigénio.

**SO<sub>2</sub>:** Vinho branco suplementado com dióxido de enxofre (50 mg/L na forma livre).

### Análise estatística dos extractos de acetato de etilo/hexano de vinho branco

		<b>ABTS</b>			<b>DPPH</b>		
		<i>Testemunho</i>	<i>O<sub>2</sub></i>	<i>SO<sub>2</sub></i>	<i>Testemunho</i>	<i>O<sub>2</sub></i>	<i>SO<sub>2</sub></i>
<b>AcEtilo/Hexano 20</b>	<i>Média</i>	7,7	9,8	12,0	5,9	6,8	11,7
	<i>N</i>	3	3	3	3	3	3
	<i>Desvio Padrão</i>	0,3	0,2	0,1	0,1	0,2	1,4
<b>AcEtilo/Hexano 60</b>	<i>Média</i>	9,2	7,5	13,4	7,0	7,1	26,8
	<i>N</i>	3	3	3	3	3	3
	<i>Desvio Padrão</i>	0,5	0,1	0,2	0,4	0,5	2,5

Tabela 15 – Médias e desvios padrão do efeito da temperatura para os extractos de acetato de etilo/hexano de vinho branco.

<b>AcEtilo/Hexano</b>	<b>ANOVA</b>	<i>Soma dos quadrados</i>	<i>df</i>	<i>Média dos quadrados</i>	<i>F</i>	<i>Sg.</i>	<i>Conclusão</i>
<b>Test_ABTS</b>	Entre Grupos	3,7	1	3,7	20,9	<b>0,010</b>	<b>Há diferenças</b>
	Dentro Grupos	0,7	4	0,2			
	Total	4,4	5				
<b>O<sub>2</sub>_ABTS</b>	Entre Grupos	7,7	1	7,7	298,0	<b>0,000</b>	<b>Há diferenças</b>
	Dentro Grupos	0,1	4	0,0			
	Total	7,8	5				
<b>SO<sub>2</sub>_ABTS</b>	Entre Grupos	2,9	1	2,9	124,7	<b>0,000</b>	<b>Há diferenças</b>
	Dentro Grupos	0,1	4	0,0			
	Total	3,0	5				
<b>Test_DPPH</b>	Entre Grupos	1,9	1	1,9	18,0	<b>0,013</b>	<b>Há diferenças</b>
	Dentro Grupos	0,4	4	0,1			
	Total	2,3	5				
<b>O<sub>2</sub>_DPPH</b>	Entre Grupos	0,2	1	0,2	1,2	0,338	<b>Não há diferenças</b>
	Dentro Grupos	0,6	4	0,1			
	Total	0,7	5				
<b>SO<sub>2</sub>_DPPH</b>	Entre Grupos	341,9	1	341,9	83,8	<b>0,001</b>	<b>Há diferenças</b>
	Dentro Grupos	16,3	4	4,1			
	Total	358,2	5				

Tabela 16 – Anovas do efeito da temperatura para os extractos de acetato de etilo/hexano de vinho branco.

À semelhança dos extractos obtidos com hexano, a capacidade antioxidante dos compostos extraídos com acetato de etilo e reextraídos com hexano parece aumentar com a temperatura. Este acréscimo pode estar relacionado também, à semelhança dos extractos de hexano, com a formação de produtos que se geram durante o aquecimento, como é o caso dos produtos da reacção de Maillard (Manzocco *et al.*, 1999; Nicoli *et al.*, 1997; Anese *et al.*, 1998). Este aumento verifica-se em todos os tratamentos (testemunho, O<sub>2</sub> e SO<sub>2</sub>), para ambos os métodos utilizados (ABTS e DPPH), à excepção dos extractos derivados do tratamento com oxigénio e avaliados pelo método do ABTS (O<sub>2</sub>\_ABTS), em que a capacidade antioxidante dos compostos extraídos com este solvente diminui cerca de 23,1 % (*Sig.* = 0,000) com o aumento da temperatura. Para os extractos avaliados a partir do método do DPPH no vinho saturado com oxigénio (O<sub>2</sub>\_DPPH) o aumento da capacidade antioxidante com o aumento da temperatura não tem significância estatística (*Sig.* > 0,05; **Tabela 16**).

### 3.4.1.3 - Fracção acetato de etilo/acetona (Extractos\_3)

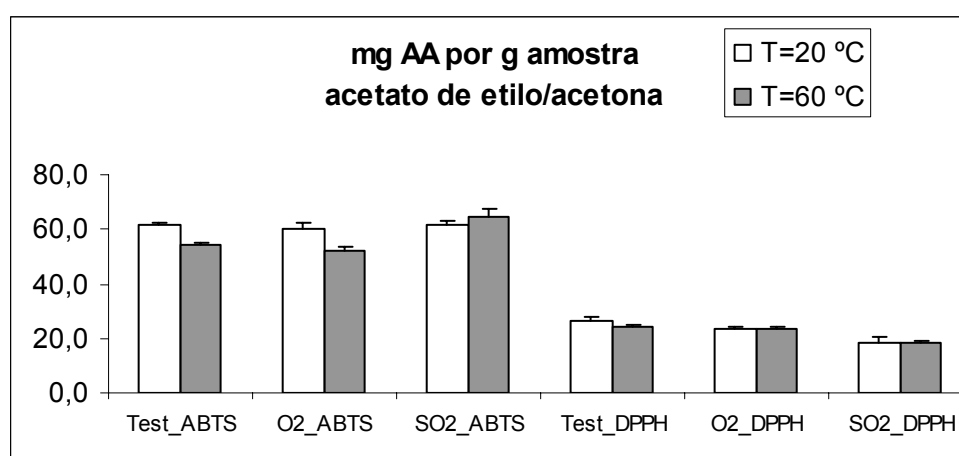


Figura 44 – Comparação do efeito da temperatura na actividade antioxidante das fracções extraídas com acetato de etilo e reextraídas com acetona.

A actividade antioxidante está expressa em quantidade (miligramas) de ácido ascórbico por quantidade (gramas) de extracto.

**Test:** Vinho branco controlo.

**O<sub>2</sub>:** Vinho branco sujeito a quatro saturações com oxigénio.

**SO<sub>2</sub>:** Vinho branco suplementado com dióxido de enxofre (50 mg/L na forma livre).

### Análise estatística dos extractos de acetato de etilo/acetona de vinho branco

		<i>ABTS</i>			<i>DPPH</i>		
		<i>Testemunho</i>	<i>O<sub>2</sub></i>	<i>SO<sub>2</sub></i>	<i>Testemunho</i>	<i>O<sub>2</sub></i>	<i>SO<sub>2</sub></i>
<b>AcEtilo/ Acetona 20</b>	<i>Média</i>	61,7	60,2	61,4	26,4	23,5	18,6
	<i>N</i>	3	3	3	3	3	3
	<i>Desvio Padrão</i>	0,5	2,5	1,5	1,5	0,9	2,0
<b>AcEtilo/ Acetona 60</b>	<i>Média</i>	54,4	51,8	64,6	24,4	23,3	18,2
	<i>N</i>	3	3	3	3	3	3
	<i>Desvio Padrão</i>	0,3	2,1	3,1	0,6	1,3	0,8

Tabela 17 – Médias e desvios padrão do efeito da temperatura para os extractos de acetato de etilo/acetona de vinho branco.

AcEtilo/Acetona	ANOVA	Soma dos quadrados	df	Média dos quadrados	F	Sig.	Conclusão
<b>Test_ABTS</b>	Entre Grupos	78,8	1	78,8	406,7	<b>0,000</b>	<b>Há diferenças</b>
	Dentro Grupos	0,8	4	0,2			
	Total	79,6	5				
<b>O<sub>2</sub>_ABTS</b>	Entre Grupos	105,8	1	105,8	19,7	<b>0,011</b>	<b>Há diferenças</b>
	Dentro Grupos	21,5	4	5,4			
	Total	127,4	5				
<b>SO<sub>2</sub>_ABTS</b>	Entre Grupos	15,3	1	15,3	2,6	0,183	Não há diferenças
	Dentro Grupos	23,6	4	5,9			
	Total	38,9	5				
<b>Test_DPPH</b>	Entre Grupos	6,1	1	6,1	4,9	0,091	Não há diferenças
	Dentro Grupos	5,0	4	1,2			
	Total	11,1	5				
<b>O<sub>2</sub>_DPPH</b>	Entre Grupos	0,1	1	0,1	0,1	0,825	Não há diferenças
	Dentro Grupos	4,8	4	1,2			
	Total	4,8	5				
<b>SO<sub>2</sub>_DPPH</b>	Entre Grupos	0,2	1	0,2	0,1	0,780	Não há diferenças
	Dentro Grupos	9,5	4	2,4			
	Total	9,7	5				

Tabela 18 – Anovas do efeito da temperatura para os extractos de acetato de etilo/acetona de vinho branco.

Os compostos extraídos com acetato de etilo e reextraídos com acetona (compostos mais polares) são os que apresentam a maior capacidade antioxidante. Destes extractos, com maior poder antioxidante, o saturado com oxigénio e sujeito à temperatura de 60 °C apresenta valores inferiores em relação aos compostos sujeitos a saturação com oxigénio mas mantidos a 20 °C (51,8 mg AA/g versus 60,2 mg AA/g) para o método do ABTS (*Sig.* = 0,011). Para o método do DPPH esta diferença não tem significado estatístico. Em relação ao efeito temperatura podemos dizer que a capacidade antioxidante dos compostos extraídos com acetato de etilo e reextraídos com acetona parece diminuir com a temperatura, à excepção dos extractos derivados do tratamento com dióxido de enxofre e avaliados pelo método do ABTS (SO<sub>2</sub>\_ABTS), embora sem significado estatístico.

Manzocco *et al.* (1999) relatou que em vinho cozido, sujeito a tratamento por aquecimento, a formação de produtos com propriedades antioxidantes pode contrabalançar a perda de compostos polifenólicos antioxidantes levando a um aumento da actividade antioxidante total. No entanto, nestes extractos mais polares, e ao contrário do que se verificou para os extractos menos polares (Extractos\_1 e Extractos\_2), tal não se verifica talvez por serem os extractos com maior quantidade deste tipo de compostos fenólicos onde a sua perda, por consumo de oxigénio, é maior do que uma possível formação de novos compostos antioxidantes.

Como conclusão geral deste ponto do trabalho podemos dizer que, à excepção dos extractos derivados do tratamento com oxigénio, o tratamento com temperatura parece conduzir a um aumento na capacidade antioxidante dos extractos menos polares. (Extractos\_1 e Extractos\_2). Nos extractos mais polares (Extractos\_3), tanto o tratamento com oxigénio como o tratamento com temperatura conduzem a uma diminuição da actividade antioxidante dos mesmos.

### **3.4.2 – Comparação do efeito oxigénio**

#### **3.4.2.1 - *Fracção acetato de etilo/acetona (Extractos\_3)***

Nesta secção foi realizada uma comparação do efeito oxigénio apenas para as fracções de acetato de etilo/acetona, que representam a maior percentagem de actividade antioxidante total extraída.



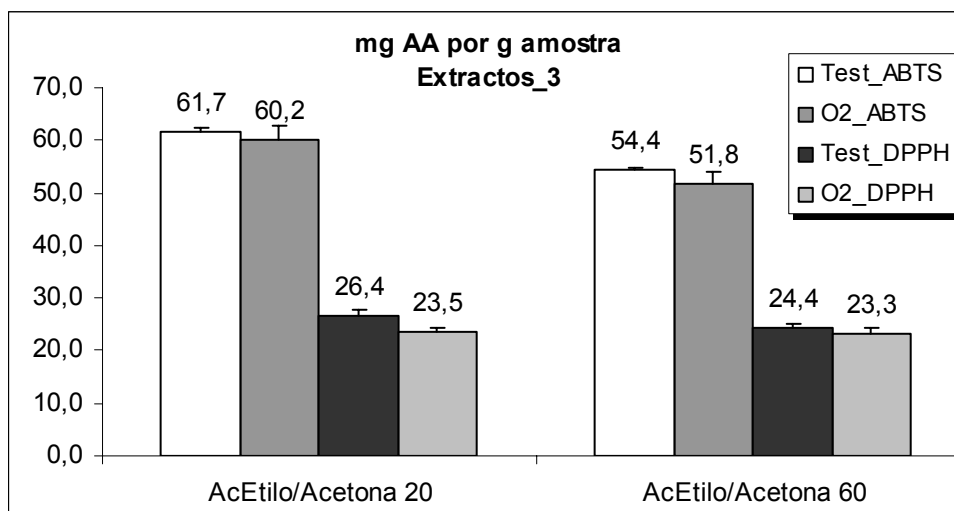


Figura 45 – Comparação do efeito oxigénio na actividade antioxidante das fracções extraídas com acetato de etilo e fraccionadas com acetona.

A actividade antioxidante está expressa em quantidade (miligramas) de ácido ascórbico por quantidade (gramas) de extracto.

**Test:** Vinho branco controlo.

**O<sub>2</sub>:** Vinho branco sujeito a quatro saturações com oxigénio.

AcEtilo/Acetona	Teste T	
	P-value	Conclusão
<b>ABTS_20</b>	0,366	Não há diferenças
<b>ABTS_60</b>	0,099	Não há diferenças
<b>DPPH_20</b>	0,036	<b>Há diferenças</b>
<b>DPPH_60</b>	0,220	Não há diferenças

Alfa = 0,05 (nível de significância)

Tabela 19 – Teste T do efeito oxigénio para os extractos de acetato de etilo/acetona.

Os compostos extraídos com acetato de etilo e fraccionados com acetona são os que apresentam a maior capacidade antioxidante. O extracto

correspondente à fracção de acetato de etilo/acetona do vinho branco saturado com oxigénio é significativamente diferente do extracto do vinho não saturado, quando sujeito à temperatura de 60 °C, apresentando valores inferiores de actividade antioxidante (51,8 mg AA/g versus 54,4 mg AA/g) (**Figura 45**) para o método do ABTS. Para o método do DPPH as diferenças não são significativas. No entanto, para o método do DPPH e para a temperatura de 20 °C, existem diferenças significativas no tratamento com oxigénio, onde o extracto correspondente à fracção de acetato de etilo/acetona do vinho saturado com oxigénio apresenta valores inferiores de actividade antioxidante (23,5 mg AA/g versus 26,4 mg AA/g) (**Figura 45**).

De uma maneira geral podemos dizer que o tratamento com oxigénio parece conduzir a uma diminuição na capacidade antioxidante dos extractos mais polares, quer a 20 °C quer a 60 °C, embora estas diferenças nem sempre sejam significativas (**Tabela 19**).

### **3.4.3 - Resultados obtidos nos vinhos brancos sujeitos ao protocolo de envelhecimento forçado não sujeitos a extracção**

Para tentar compreender a natureza dos mecanismos envolvidos na protecção ao oxigénio foi igualmente determinada, nos vinhos brancos sujeitos ao protocolo de envelhecimento forçado de vinho branco, a actividade antioxidante dos mesmos, pelos métodos do ABTS e do DPPH descritos na secção 2.3 da

Parte Experimental. A **Figura 46** representa os valores de actividade antioxidante totais dos vinhos sujeitos ao protocolo de envelhecimento forçado, enquanto que a **Figura 47** e a **Tabela 20** representam a comparação do efeito oxigénio na actividade antioxidante dos vinhos e os respectivos testes de significância.

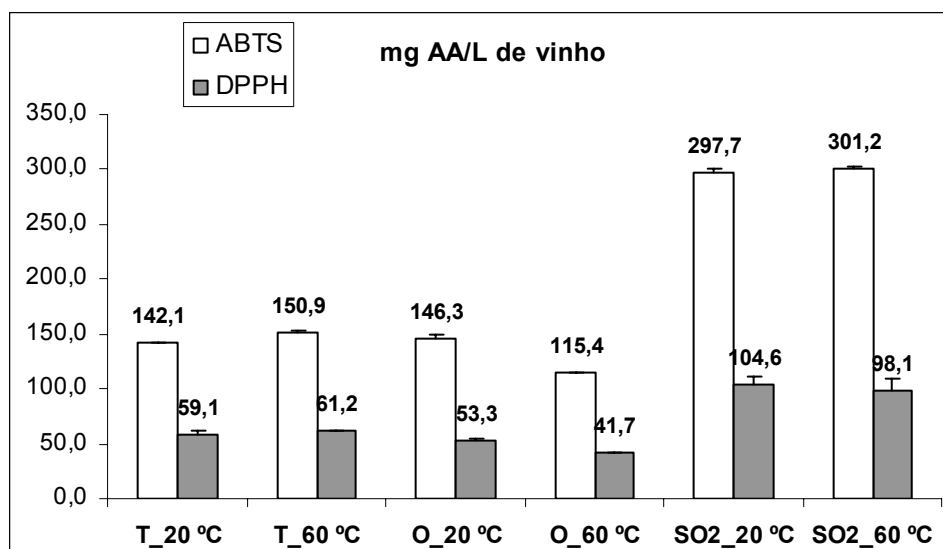


Figura 46 – Valores de actividade antioxidante totais dos vinhos brancos sujeitos ao protocolo de envelhecimento forçado.

**T:** Vinho branco controlo.

**O:** Vinho branco sujeito a quatro saturações com oxigénio.

**SO<sub>2</sub>:** Vinho branco suplementado com dióxido de enxofre (50 mg/L na forma livre).

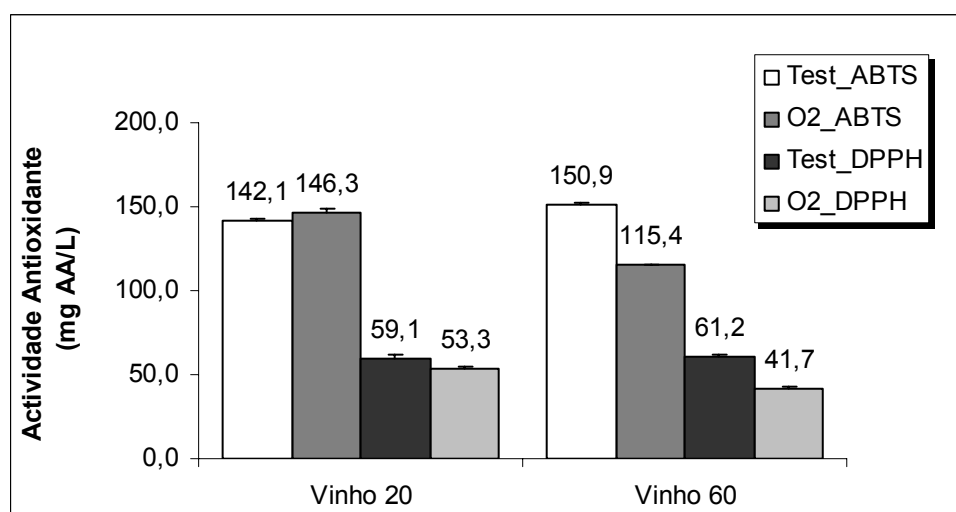


Figura 47 – Comparação do efeito oxigénio na actividade antioxidante dos vinhos brancos.

A actividade antioxidante está expressa em quantidade (miligramas) de ácido ascórbico por litro de vinho branco.

<b>Vinho</b>	<b>Teste T</b>	
	<i>P-value</i>	<i>Conclusão</i>
<b>ABTS_20</b>	0,501	Não há diferenças
<b>ABTS_60</b>	0,000	<b>Há diferenças</b>
<b>DPPH_20</b>	0,041	<b>Há diferenças</b>
<b>DPPH_60</b>	<0,0001	<b>Há diferenças</b>

Alfa = 0,05 (nível de significância)

Tabela 20 – Teste T do efeito oxigénio para os vinhos brancos.

Em relação ao vinho branco submetido à temperatura de 60 °C (T\_60) este apresenta valores superiores de actividade antioxidante em relação ao vinho submetido à temperatura de 20 °C (T\_20) para ambos os métodos utilizados (**Figura 46**). Este resultado, também verificado nas fracções mais apolares das extracções efectuadas, está de acordo com o descrito por vários autores (Manzocco *et al.*, 1999; Nicoli *et al.*, 1997; Anese *et al.*, 1998).

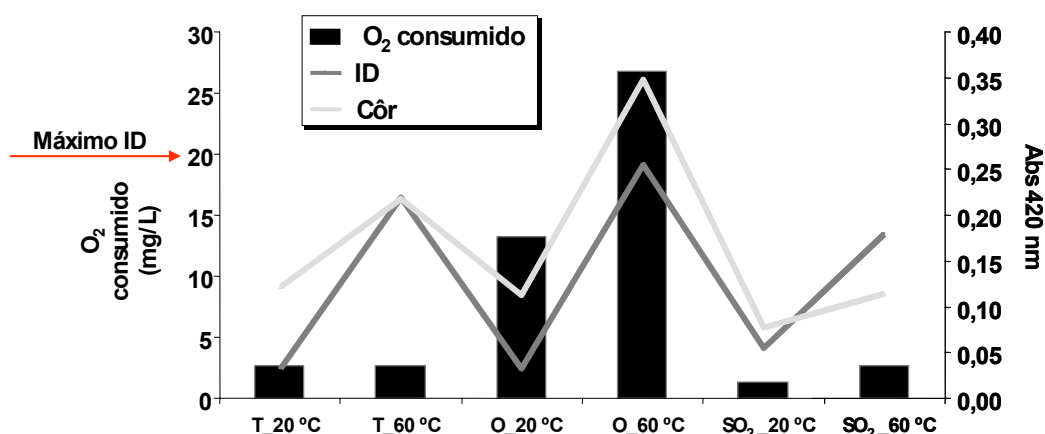
Em relação ao vinho branco submetido a saturação com oxigénio, mas mantido à temperatura de 20 °C, não apresenta variações significativas em relação ao vinho testemunho, para o método do ABTS (**Figura 47 e Tabela 20**).

O tratamento com oxigénio conduz a uma diminuição na capacidade antioxidante dos vinhos, a 60 °C, para ambos os métodos (**Figura 47 e Tabela 20**).

Os vinhos brancos suplementados com dióxido de enxofre a valores de 50 mg/L na forma livre (SO<sub>2</sub>\_20 e SO<sub>2</sub>\_60) têm cerca de 2 vezes mais actividade antioxidante que os correspondentes não suplementados (**Figura 46**). Este resultado não está de acordo com os obtidos por Manzocco *et al.* (1999), em que soluções de etanol e água a 12 % (V/V) com 250 mg/L de dióxido de enxofre, apesar de possuírem uma grande capacidade para consumir oxigénio não apresentam actividade anti-radicalar para o radical DPPH<sup>•</sup>, utilizado neste trabalho. Além disso, adições de 50 mg/L de metabissulfito de sódio em água não afectam as medidas do TAS (“actividade antioxidante total”) apartir da reacção com o radical ABTS<sup>•+</sup> (McCusker *et al.*), também utilizado neste trabalho. Quimicamente o SO<sub>2</sub> é muito reactivo e existe, no vinho, sob duas formas, forma livre (não combinada) e forma combinada. A forma livre consiste na forma molecular (SO<sub>2</sub>), ião bissulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) e ião sulfito (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>). As proporções de cada uma das três formas dependem do pH, onde vinhos mais ácidos apresentam maior quantidade da forma não ionizada. Nas condições do vinho, o dióxido de enxofre aquoso existe sob a forma de ião bissulfito, o que significa que possui um átomo de hidrogénio para ceder, e por isso com poder anti-radicalar. Em soluções neutras, como é o caso das experiências de Manzocco *et al.* (1999), o SO<sub>2</sub> poder-se-à encontrar na forma de ião sulfito, numa maior percentagem, a qual já não possui átomos de hidrogénio para ceder, diminuindo e/ou eliminando o seu poder anti-radicalar.

### 3.4.3.1 - Análises complementares efectuadas aos vinhos brancos sujeitos ao protocolo de envelhecimento forçado

Para melhor compreender a natureza dos mecanismos envolvidos na resistência à oxidação foram igualmente realizadas, nos vinhos brancos sujeitos ao protocolo de envelhecimento forçado de vinho branco, algumas análises complementares como o oxigénio consumido durante o protocolo, o índice de degradação aromática, determinado por um painel treinado, e o índice de cor, que traduz a degradação cromática dos mesmos. A **Figura 48** representa os valores das referidas análises nos vinhos brancos sujeitos ao protocolo de envelhecimento forçado. A **Tabela 21** representa as correlações encontradas para a actividade antioxidante, o oxigénio consumido, o índice de degradação aromático e a cor dos vinhos.



**ID:** Índice de degradação aromática (0-20).

Figura 48 – Gráfico do oxigénio consumido, índice de degradação aromática e cor dos vinhos brancos sujeitos ao protocolo de envelhecimento forçado.

	<i>O<sub>2</sub> consumido</i>	<i>ID</i>	<i>Abs (420 nm)</i>	<i>ABTS</i>	<i>DPPH</i>
<i>O<sub>2</sub> consumido</i>	1				
<i>ID</i>	0,201	1			
<i>Abs (420 nm)</i>	<b>0,583</b>	<b>0,804</b>	1		
<i>ABTS</i>	<b>-0,596</b>	-0,155	<b>-0,624</b>	1	
<i>DPPH</i>	<b>-0,705</b>	-0,224	<b>-0,680</b>	<b>0,985</b>	1

Tabela 21 – Correlações encontradas para a actividade antioxidante, oxigénio consumido, índice de degradação aromática e côr dos vinhos brancos sujeitos ao protocolo de envelhecimento forçado.

Quanto maior o oxigénio consumido menor é a actividade antioxidante dos vinhos brancos analisados com coeficientes de correlação de **- 0,596** e **- 0,705** para os métodos do ABTS e DPPH respectivamente (**Tabela 21**). O vinho sujeito a quatro saturações com oxigénio e submetido à temperatura de 60 °C é o que apresenta menor actividade antioxidante (115,4 mg de AA/L e 41,7 mg de AA/L, respectivamente) para os métodos do ABTS e DPPH (**Figura 46**).

Não existe correlação entre o índice de degradação aromática e os métodos de avaliação da capacidade antioxidante que envolvem a captura de radicais (ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup>) utilizados neste trabalho.

Das análises efectuadas é possível concluir que, em comparação com os extractos das fracções obtidas após o fraccionamento, as diferenças encontradas nos efeitos oxigénio e dióxido de enxofre (20 °C e 60 °C) são mais relevantes quando se aplicam os métodos de avaliação de actividade antioxidante, atrás descritos, ao vinho branco sem fraccionamento. Este facto poder-se-à dever à manipulação das amostras quando se aplica o método de fraccionamento. Uma vez manipulados, os extractos das várias fracções libertam todo o oxigénio e dióxido de enxofre que pudessem estar presentes nos vinhos, eliminando o possível efeito anti-radicalar destas moléculas nos métodos aplicados. Assim, apenas os efeitos do oxigénio e dióxido de enxofre nas moléculas existentes no vinho, como a formação de novas moléculas com possível poder antioxidante e/ou desaparecimento de outras, são avaliados.

### 3.4.3.2 - Comparação da actividade antioxidante dos vinhos brancos analisados com as respectivas fracções extraídas com os diferentes solventes

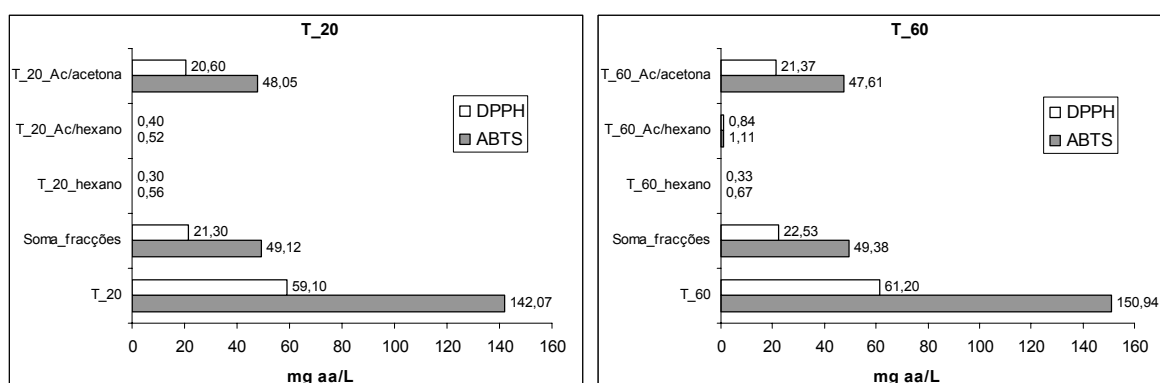


Figura 49 – Percentagem de extracção de compostos com actividade antioxidante para o vinho branco testemunho.

Para o vinho branco testemunho a percentagem de extracção de compostos com actividade antioxidante encontra-se entre os 35 % e 36 %, para a temperatura de 20 °C e 33 % e 37 % para a temperatura de 60 °C, respectivamente para o método do ABTS e DPPH.

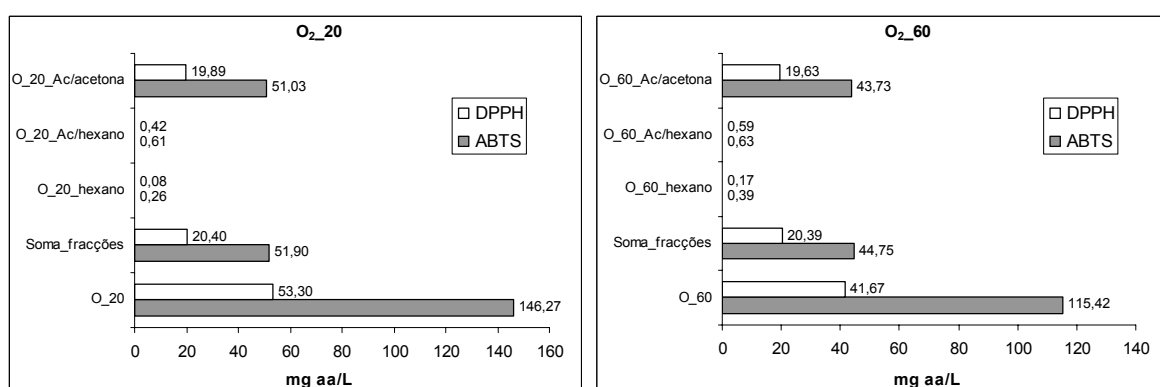


Figura 50 – Percentagem de extracção de compostos com actividade antioxidante para o efeito oxigénio.



Para o efeito oxigénio a percentagem de extracção de compostos com actividade antioxidante encontra-se entre os 35 % e 38 %, para a temperatura de 20 °C e 39 % e 49 % para a temperatura de 60 °C, respectivamente para o método do ABTS e DPPH.

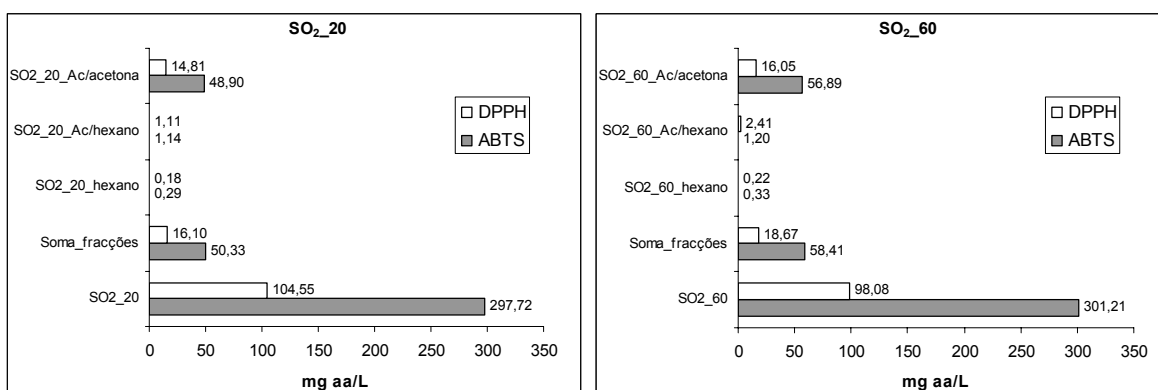


Figura 51 – Percentagem de extracção de compostos com actividade antioxidante para o efeito SO<sub>2</sub>.

Para o efeito SO<sub>2</sub> a percentagem de extracção de compostos com actividade antioxidante encontra-se entre os 17 % e 15 % para a temperatura de 20 °C e 19 % para a temperatura de 60 °C, respectivamente para o método do ABTS e DPPH.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos na secção 3.1 dos Resultados e Discussão, onde a percentagem de compostos com actividade antioxidante extraídos com a técnica de fraccionamento desenvolvida neste trabalho, foi cerca de 34 %, fracção orgânica, sendo a fracção aquosa do vinho composta pelos restantes 66 % de compostos com actividade antioxidante. Esta percentagem, no caso do efeito SO<sub>2</sub>, é um pouco mais baixa (15 % a 20 %), no entanto, e como já vimos anteriormente na secção 3.2 dos Resultados e Discussão, neste trabalho, o dióxido de enxofre fica cerca de 99,8 % na fracção aquosa não sendo assim extraído com esta técnica de fraccionamento.

#### 3.4.4 - Espectros de RMN de $^1\text{H}$

Nesta parte do trabalho fomos analisar os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extractos mais relevantes do protocolo de envelhecimento forçado. Para além dos extractos orgânicos foi ainda analisado um extracto aquoso correspondente ao vinho testemunho. Devido à dificuldade em analisar os extractos aquosos por RMN e, como já tinha sido referido anteriormente, os extractos orgânicos são preferencialmente consumidos ao longo do tempo constituindo, assim, a primeira linha de defesa do vinho à resistência à oxidação, apenas se procedeu à análise do extracto aquoso mais relevante, ou seja, a parte do vinho branco que contém maior concentração em compostos antioxidantes.

A **Figura 52** representa os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  referentes ao vinho branco testemunho do protocolo de envelhecimento forçado, nomeadamente, da fracção aquosa, que corresponde aos restos de vinho após o fraccionamento, e da fracção orgânica, que corresponde ao Extracto\_3 do mesmo vinho.

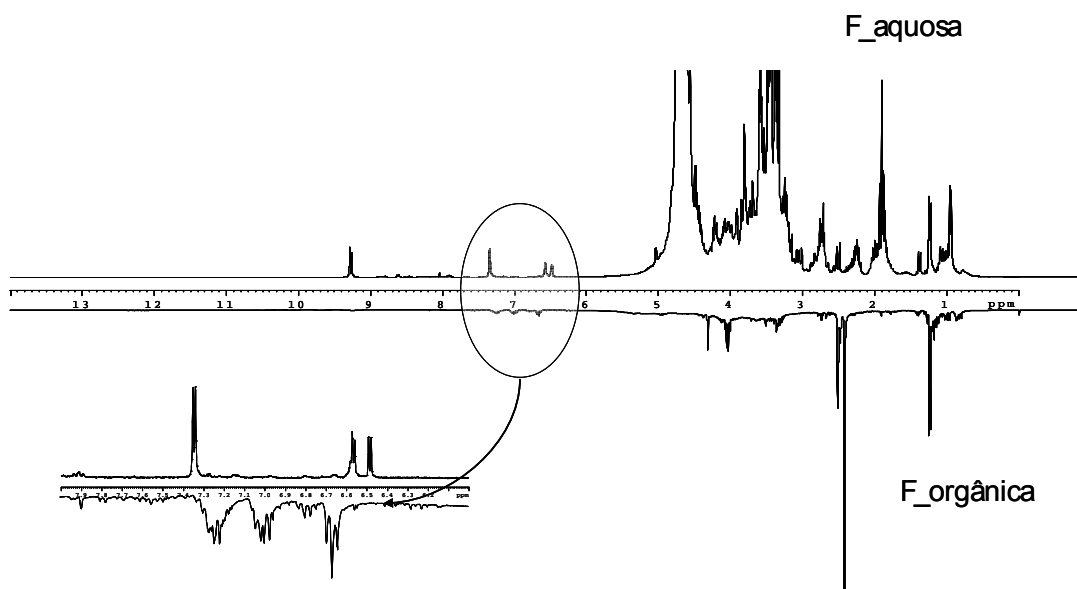


Figura 52 – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das fracções aquosa e orgânica do vinho branco testemunho.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das fracções aquosa e orgânica do vinho branco testemunho apresentam perfis diferentes (**Figura 52**). Além disso, a zona correspondente aos compostos aromáticos, de 6 a 8 ppm, onde se encontram os compostos fenólicos também é bastante diferente. Mais à frente, neste trabalho, estes espectros irão ser analisados com mais pormenor. As **Figuras 53 e 54** referem-se aos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  das fracções orgânicas dos vinhos brancos testemunho e saturado com oxigénio mantidos à temperatura de 20 °C e 60 °C. A **Tabela 22** representa os integrais dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  da fracção orgânica para os vinhos brancos testemunho e saturado com oxigénio.

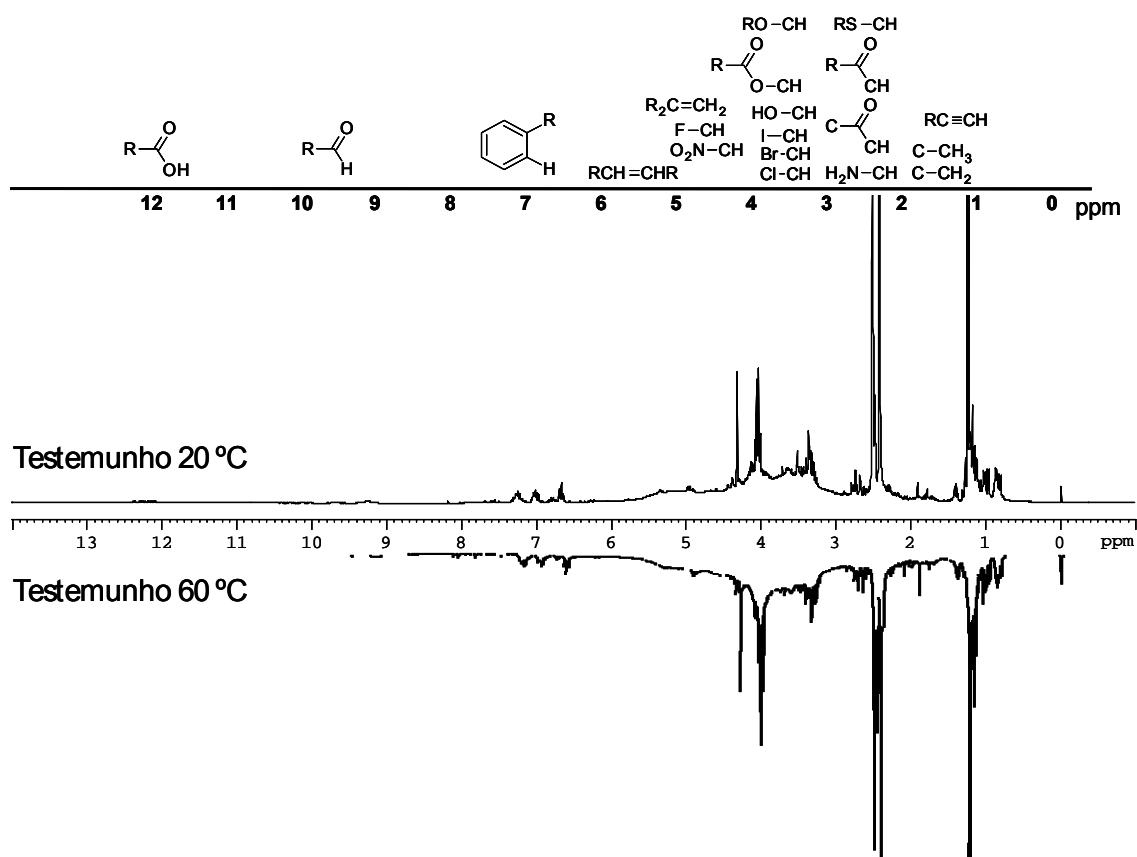


Figura 53 – Comparação dos espectros de RMN de  $^1H$  dos extractos de AcEtilo/Acetona do vinho branco testemunho mantido à temperatura de 20 °C e 60 °C.

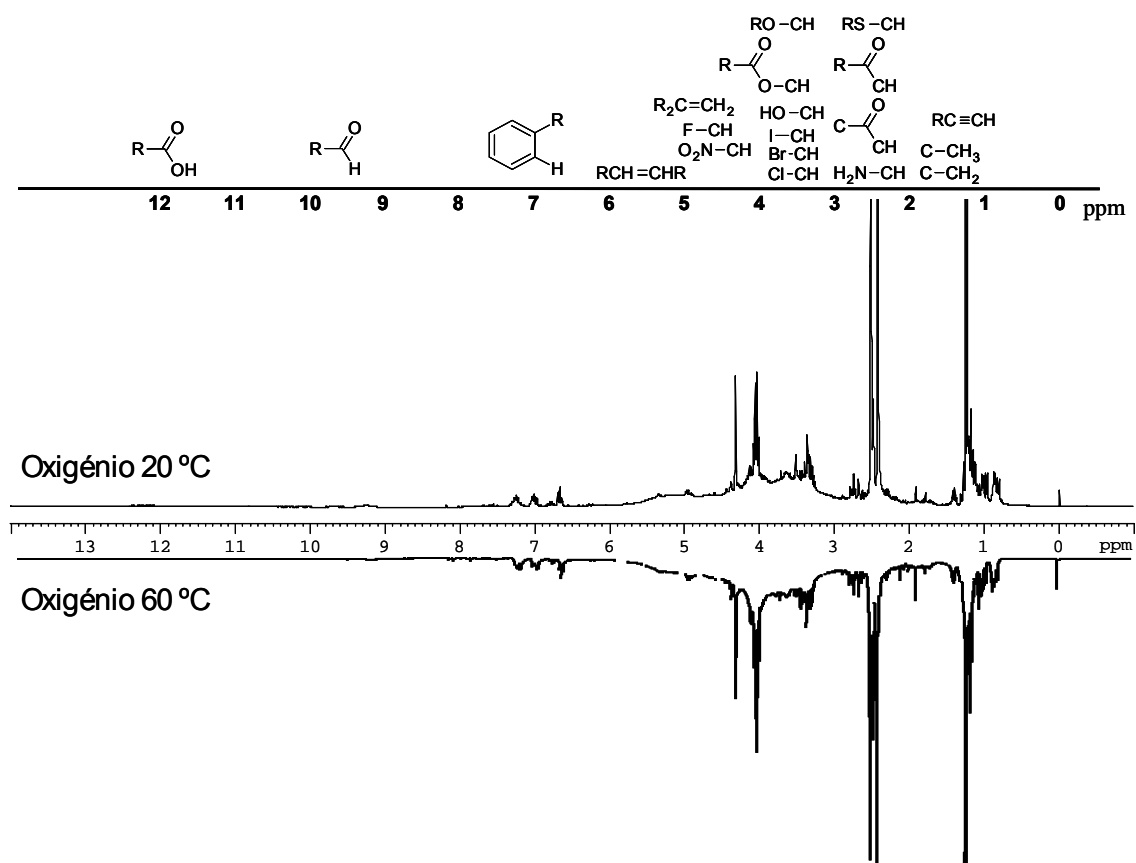


Figura 54 – Comparação dos espectros de RMN de  $^1H$  dos extractos de AcEtilo/Acetona do vinho branco saturado com oxigénio mantido à temperatura de 20 °C e 60 °C.

Zona espectral (ppm)	8 a 6	4,5 a 3	2 a 1
Testemunho 20 °C	1	8,43	3,63
Testemunho 60 °C	1	19,57	9,63
Oxigénio 20 °C	1	9,30	7,74
Oxigénio 60 °C	1	93,50	31,29

Tabela 22 – Integrais dos espectros de RMN de  $^1H$  dos extractos de AcEtilo/Acetona para os vinhos brancos testemunho e saturado com oxigénio.

Os espectros de RMN de  $^1H$  das **Figuras 53 e 54** apresentam perfis idênticos, no entanto, uma análise quantitativa destes espectros a partir dos seus integrais permitem verificar que, comparando os integrais das diferentes zonas indicadas na **Tabela 22** é possível verificar que a zona espectral correspondente

aos compostos da zona aromática (6 a 8 ppm) está normalizada. Contudo, como os integrais das diferentes zonas são diferentes, podemos afirmar que comparativamente ao vinho branco testemunho (Testemunho 20 °C), a zona dos compostos aromáticos (6 a 8 ppm) é cerca de **10 vezes menor** no extracto do vinho branco saturado com oxigénio e mantido à temperatura de 60 °C e cerca de **2 vezes menor** no extracto do vinho branco testemunho e mantido à temperatura de 60 °C. O extracto do vinho branco saturado com oxigénio e mantido à temperatura de 20 °C apresenta valores de compostos aromáticos ligeiramente inferiores os valores encontrados para o extracto do vinho branco testemunho (Testemunho 20 °C) (**Tabela 22**).

Nos espectros das **Figura 53 e 54** é possível visualizar 4 zonas distintas. A primeira zona, compreendida entre 1 e 2 ppm, diz respeito a protões do tipo C-CH<sub>2</sub>-C e C-CH<sub>3</sub>.

A segunda zona, compreendida entre 2 e 3 ppm, abrange protões alfa de compostos do tipo aminas, grupos sulfídricos e cetonas. Existe uma pequena quantidade de aminas biogénicas no vinho (até 10 mg/L) e pequenas quantidades de açúcares aaminados (glucosamina e galactosamina). Ainda dentro desta zona existem compostos contendo enxofre do tipo tióis, de elevado peso molecular, nomeadamente: metionol, 2-metiltioetanol, 2-metil-tetra-hidrotiofenona, etc.

A terceira zona, compreendida entre 3 e 4,5 ppm, abrange duas importantes famílias de compostos existentes no vinho, os álcoois e os ésteres. Também fazem parte deste grupo as amidas (asparagina, glutamina) com algumas centenas de miligramas por litro. A ureia e o carbamato de etilo também estão incluídos neste grupo. O vinho contém pequenas quantidades de ureia (menos de 1 mg/L) que pode ser um precursor do carbamato de etilo. Logo a seguir à água que representa 85 % a 90 % do volume do vinho, o etanol (p. e. = 78,3 °C) é o constituinte mais abundante (10 a 20 g/L) sendo o suporte do aroma e do “bouquet” do vinho. Existem outros álcoois nomeadamente o glicerol [p. e. = 290 °C (5 a 20 g/L)], o 2,3-butanodiol [p. e. = 184 °C (0,3 a 1,35 g/L)] e o metanol

[p. e. = 64,6 °C (8 a 300 mg/L)] que aparecem em quantidades significativas no vinho. Os álcoois superiores, 1-propanol (p. e. = 97,2 °C), 1-butanol (p. e. = 117,6 °C), 2-metil-1-propanol (p. e. = 107,9 °C), 2-metil-1-butanol (p. e. = 129 °C) e 3-metil-1-butanol (p. e. = 130 °C) são igualmente abundantes juntamente com o 2-fenil-etanol (p. e. = 432 °C a 0 mm).

Os ésteres são conjuntamente com os álcoois superiores, o etanol e a água os constituintes maioritários do vinho. Em maior quantidade estão presentes os ésteres etílicos de ácidos orgânicos, sendo o lactato de etilo o mais abundante (0,5 a 400 mg/L), seguindo-se os acetatos de álcoois superiores, sendo o acetato de etilo o mais abundante (0,15 a 300 mg/L) e, em menor quantidade, os ésteres etílicos de ácidos gordos.

Existe ainda uma quantidade de compostos no vinho que podem estar na forma esterificada.

A quarta zona, compreendida entre 6 e 8 ppm, refere-se aos compostos aromáticos. No vinho existem 4 grandes grupos de compostos aromáticos nomeadamente: ácidos fenólicos, flavonóides, antocianinas e taninos. Destes grupos devemos excluir as antocianinas, que correspondem aos pigmentos vermelhos das uvas tintas, uma vez que se trata de uma análise de vinho branco. Dentro da família dos flavonóides é possível encontrar em vinhos brancos 1 a 3 mg/L de flavonóis, nomeadamente, o campferol e a quercetina. Os taninos podem existir em vinhos brancos na ordem de algumas dezenas de miligrama por litro podendo ser encontrados na forma de taninos gálicos ou de taninos condensados (monómeros de catequina e epicatequina).

É de salientar que alguns destes compostos nomeadamente os taninos dificilmente serão extraídos no sistema de extracção utilizado neste trabalho, uma vez que são compostos solúveis em água e ficarão na fracção aquosa do vinho. Além disso, álcoois e ésteres com pontos de ebulição muito baixos serão

eliminados durante o procedimento de fraccionamento devido ao processo de evaporação a que os extractos são sujeitos.

### 3.4.5 - Espectros de RMN de $^{13}\text{C}$

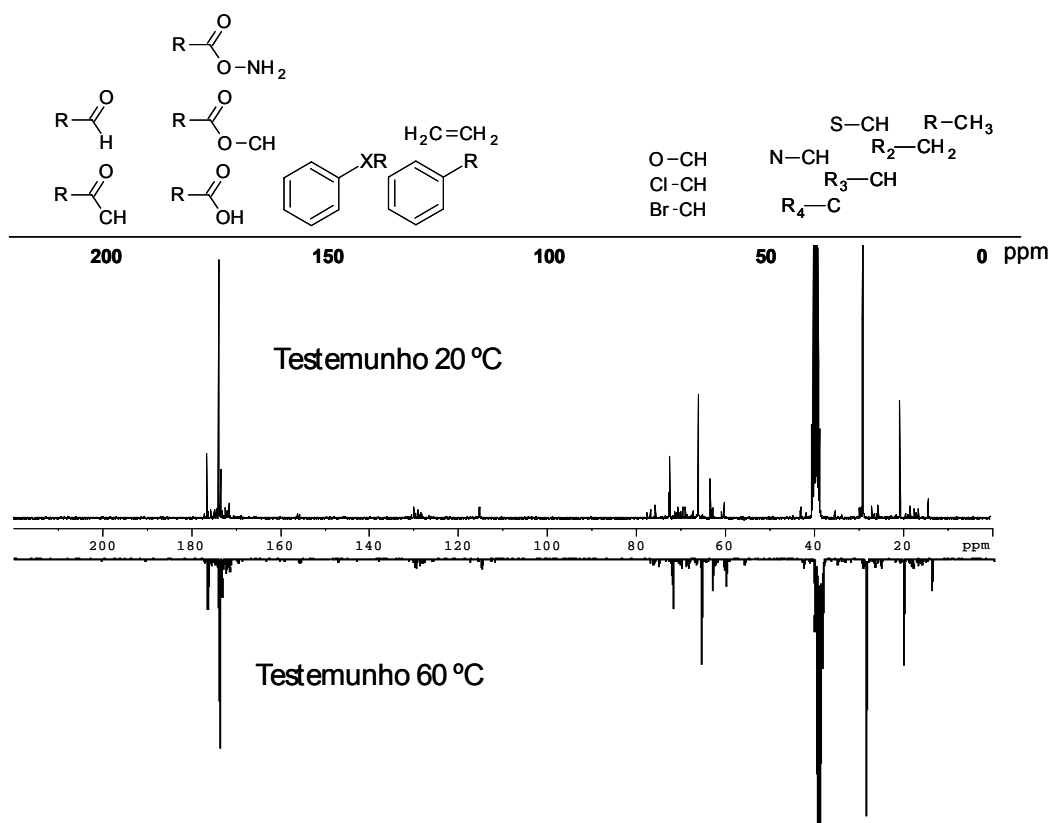


Figura 55 – Comparação dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos extractos de AcEtilo/Acetona do vinho branco testemunho mantido à temperatura de 20 °C e 60 °C.



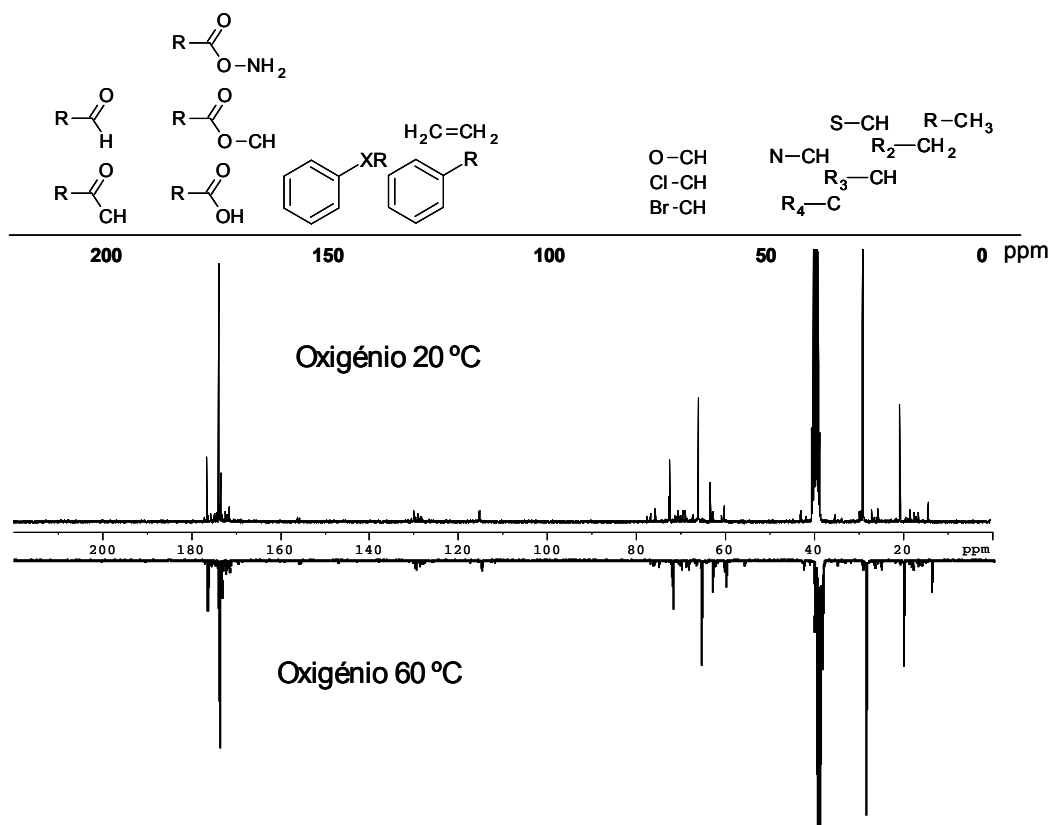


Figura 56 – Comparação dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos extractos de AcEtilo/Acetona do vinho branco saturado com oxigênio mantido à temperatura de 20 °C e 60 °C.

Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  das **Figuras 55 e 56** apresentam perfis idênticos. Pela análise destes espectros é possível visualizar 5 zonas distintas.

A primeira zona, até  $\delta$  40 ppm, engloba maioritariamente 4 sinais: um sinal a  $\delta$  14,2 ppm e dois sinais de relativa intensidade a  $\delta$  20,6 e 28,9 ppm que se referem a carbonos saturados ( $\text{sp}_3$ ) sem elementos electronegativos do tipo  $\text{R}-\text{CH}_3$ , e um sinal a  $\delta$  39,5 ppm que corresponde ao sinal de maior intensidade de todo o espectro e que se refere ao solvente utilizado (DMSO). Poderão ainda haver carbonos saturados ( $\text{sp}_3$ ) do tipo  $\text{R}-\text{CH}_2-\text{R}$  ou  $\text{R}_3-\text{CH}$  ou carbonos ligados a átomos de enxofre como é o caso dos compostos sulfídricos. Devem ser excluídas as aminas porque não terem sido encontrados quaisquer sinais entre  $\delta$  40-50 ppm.

Na segunda zona, compreendida entre  $\delta$  60 e 80 ppm, temos vários sinais de média intensidade que se referem a carbonos saturados ( $sp_3$ ) que se podem encontrar ligados a elementos electronegativos do tipo  $R_3C-O$ .

A terceira zona, compreendida entre  $\delta$  115 e 130 ppm, refere-se à zona dos compostos aromáticos podendo englobar todos os compostos descritos anteriormente para a análise de espectros de RMN de  $^1H$ .

A quarta zona, compreendida entre  $\delta$  150 e 160 ppm, apresenta alguns sinais de baixa intensidade que se referem à zona dos compostos aromáticos ligados a elementos electronegativos.

A quinta zona, compreendida entre  $\delta$  170 e 180 ppm, refere-se ao grupo dos carbonos carbonílicos que podem ser amidas, anidridos ou ésteres. Devem ser excluídos todos os aldeídos e cetonas porque não terem sido encontrados quaisquer sinais a partir de  $\delta$  180 ppm inviabilizando a possibilidade destas famílias de compostos se encontrarem nestes extractos.

A partir da análise dos espectros de RMN de  $^{13}C$  foi possível eliminar as aminas das famílias de compostos existentes nestes extractos, uma vez que não existem os sinais típicos destas moléculas por volta dos  $\delta$  40-50 ppm. De igual forma foram excluídas as cetonas e os aldeídos, uma vez que não existem os sinais típicos destes compostos a  $\delta >180$  ppm (**Figura 55 e 56**), sendo que os últimos também já tinham sido excluídos pela análise dos espectros de RMN de  $^1H$ , uma vez que não existe o sinal típico dos aldeídos entre os  $\delta$  9 e os 10 ppm (**Figura 53 e 54**). Assim, as possíveis famílias de compostos existentes nos extractos das fracções orgânicas serão: flavonóides, derivados de ácidos fenólicos, ésteres, na maior parte sob a forma de acetatos, álcoois com elevados pontos de ebulição, amidas e compostos com grupos tióis.

### **3.4.6 - Espectros de RMN bidimensional**

HSQC – Espectro de RMN de correlação espectroscópica heteronuclear, bidimensional (detecção inversa) – Permite identificar acoplamentos entre prótons e carbonos que distam de uma ligação, em anexo.

HMBC – Espectro de RMN de correlação espectroscópica heteronuclear, bidimensional, a longa distância (detecção inversa) – Permite identificar acoplamentos entre prótons e carbonos que distam de duas e três ligações, em anexo.

COSY – Espectro de RMN de correlação espectroscópica homonuclear, bidimensional – Permite identificar acoplamentos entre prótons vizinhos, em anexo.

A análise dos espectros de RMN bidimensional irão permitir uma melhor interpretação de possíveis estruturas existentes na zona aromática, quer nos extractos de AcEtilo/Acetona das fracções orgânicas do vinho branco testemunho, quer no extracto da fracção aquosa do vinho branco testemunho.

### 3.4.7 – Ampliação da zona aromática dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ do extracto orgânico de AcEtilo/Acetona e da fracção aquosa do vinho branco testemunho

A ampliação dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  do extracto orgânico e da fracção aquosa do vinho branco testemunho permitiram, em conjunto com a análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  e dos espectros de RMN bidimensional, em anexo, uma melhor interpretação de possíveis estruturas existentes na zona aromática onde se encontram os compostos fenólicos de reconhecida actividade antioxidante.

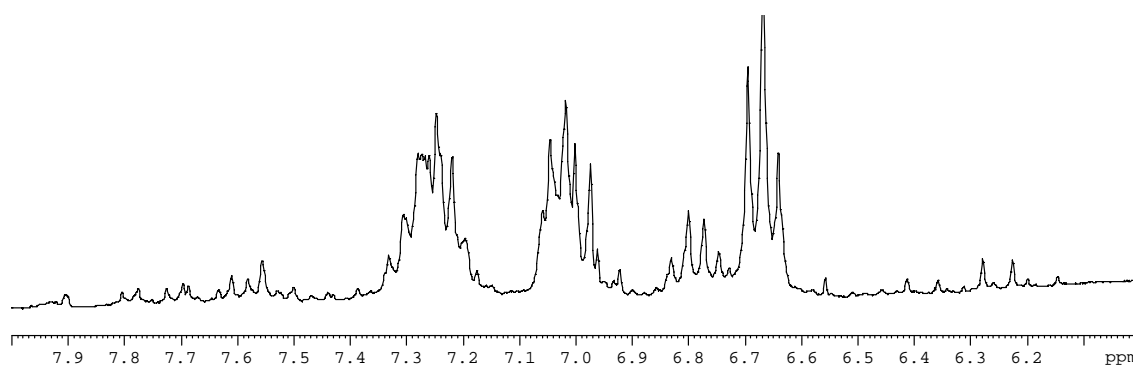


Figura 57 – Ampliação da zona aromática do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extracto orgânico de AcEtilo/Acetona do vinho branco testemunho.

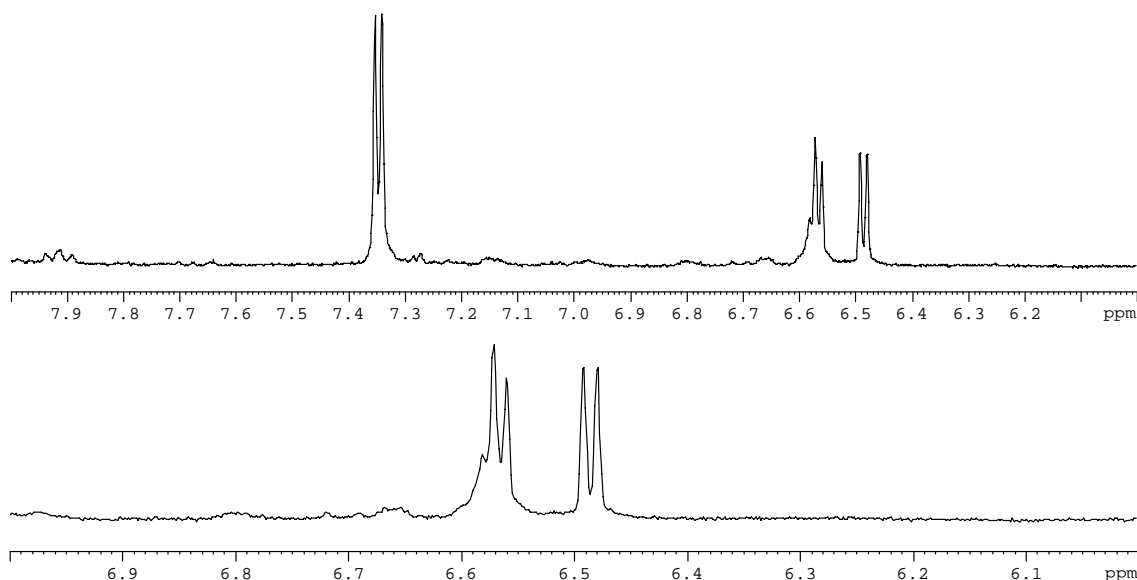
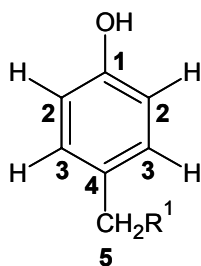


Figura 58 – Ampliação da zona aromática do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extracto aquoso do vinho branco testemunho.

Existem duas possíveis propostas de estruturas para os compostos aromáticos que existem na fracção orgânica (**Figura 59**) do vinho branco testemunho e outras duas para a fracção aquosa do mesmo vinho (**Figura 60**).



2 estruturas dependendo do  $\text{R}^1$

carbonos	desvio químico (ppm)
1	155,6; 155,9
2	115,1; 115,3
3	129,8; 129,9
4	130,0
5	35,2
H	desvio químico (ppm)
2	6,65 (d, $J=8,5$ Hz); 6,68 (d, $J=7,8$ Hz)
3	6,98 (d, $J=8,1$ Hz); 7,03 (d, $J=8,2$ Hz)

Figura 59 – Possíveis estruturas para os compostos da fracção orgânica do vinho branco testemunho.

#### **Fracção orgânica do vinho branco testemunho (Figura 59):**

Pela análise da **Figura 57** podemos concluir que existem protões aromáticos no extracto da fracção orgânica do vinho branco testemunho. Analisando os espectros de RMN bidimensional HSQC (**pág. 128 em anexo**) e de  $^{13}\text{C}$  (**Figura 55**) é possível verificar que existem dois sinais de carbono a  $\delta$  115,1 e 115,3 ppm e outros dois a  $\delta$  129,8 e 129,9 ppm. Estes sinais apresentam correlação com os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  a  $\delta$  6,65 (d,  $J=8,5$  Hz); 6,68 (d,  $J=7,8$  Hz) e 6,98 (d,  $J=8,1$  Hz); 7,03 (d,  $J=8,2$  Hz) ppm, respectivamente. Na zona aromática dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  existem mais alguns sinais, para os quais não é possível fazer corresponder nenhuma proposta de estrutura.

Através da análise do espectro de RMN bidimensional COSY (**pág. 129 em anexo**) verifica-se que estes dois conjuntos de protões, com os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  a  $\delta$  6,65 (d,  $J=8,5$  Hz); 6,68 (d,  $J=7,8$  Hz) e 6,98 (d,  $J=8,1$  Hz); 7,03 (d,  $J=8,2$  Hz) ppm, acoplam uns com os outros, o que indica que estaremos na presença de duas estruturas idênticas. Tendo em consideração o efeito dos grupos dadores de electrões (por exemplo, grupos hidroxilo e alcoxilo) podemos concluir que estamos na presença de anéis aromáticos *para*-substituídos, em que um dos substituintes será um grupo hidroxilo ou alcoxilo.

Pela análise dos espectros de RMN bidimensional HMBC (**pág. 130 em anexo**) podemos verificar que os carbonos com sinais a  $\delta$  115,1 e 115,3 ppm não acoplam com protões da zona alifática, o que parece indicar que teremos ligado a estes carbonos aromáticos um grupo hidroxilo.

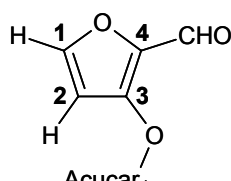
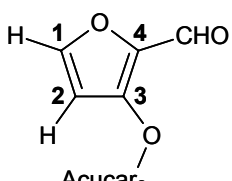
	Estrutura 1	Estrutura 2
		
Estrutura 1	Estrutura 2	
carbonos	desvio químico (ppm)	
1	129,6	129,6
2	113,9	115,8
3	164,2	161,5
4	155,0	155,0
H	desvio químico (ppm)	
1	7,35 (d, J=3,5 Hz)	7,35 (d, J=3,5 Hz)
2	6,49 (d, J=3,5 Hz)	6,57 (d, J=3,5 Hz)

Figura 60 – Possíveis estruturas para a fracção aquosa do vinho branco testemunho.

#### Fracção aquosa do vinho branco testemunho (Figura 60):

Pela análise da **Figura 58** podemos concluir que existem protões aromáticos no extracto da fracção aquosa do vinho branco testemunho. A **Figura 52**, secção 3.4.4, revela a existência de 2 protões na forma de singletos apresentando desvios químicos a  $\delta$  9,27 e 9,30 ppm que deverão corresponder à ressonância de protões de grupos aldeído, indicando que estamos na presença de duas estruturas.

Pela análise dos espectros de RMN bidimensional HSQC (**pág.131 em anexo**) é possível verificar que existem dois sinais de carbono a  $\delta$  113,9 (estrutura 1) e 115,8 ppm (estrutura 2) e um sinal a  $\delta$  129,6 ppm que se correlacionam (estrutura 1 e 2), respectivamente, com sinais de protões aromáticos a  $\delta$  6,49 (d, J=3,5 Hz) e 6,57 (d, J=3,5 Hz) ppm e a  $\delta$  7,35 (d, J=3,5 Hz) ppm.

Através da análise do espectro de RMN bidimensional COSY (**pág.132 em anexo**) verifica-se que dois destes conjuntos de protões acoplam entre si, respectivamente os sinais de protões a  $\delta$  6,49 e a  $\delta$  7,35 ppm, para a estrutura 1,

e a  $\delta$  6,57 e a  $\delta$  7,35 ppm, para a estrutura 2, o que significa que se tratam de prótons vizinhos.

Através da análise do espectro de RMN bidimensional HMBC (pág. 133 em anexo) podemos verificar que os prótons dos grupos aldeído, com sinais a  $\delta$  9,27 e 9,30 ppm, acoplam com o carbono cuja ressonância surge a  $\delta$  155,0 ppm. Por outro lado, os prótons aromáticos, a  $\delta$  7,35 ppm e a  $\delta$  6,49 e 6,57 ppm, também acoplam com o carbono cuja ressonância surge a  $\delta$  155,0 ppm e com os carbonos cujos sinais surgem a  $\delta$  164,2 e 161,5 ppm, respectivamente para a estrutura 1 e para a estrutura 2. Os carbonos com sinais a  $\delta$  98,8 poder-se-ão atribuir à ressonância de carbonos ligados a açúcares que acoplam a 1 ligação com prótons a cerca de 4,5 ppm (prótons anoméricos) que por sua vez acoplam com os carbonos com sinais a  $\delta$  164,2 e a 161,5 ppm.

### 3.5 - Resultados obtidos na extracção de vinhos do Porto tinto novo e velho

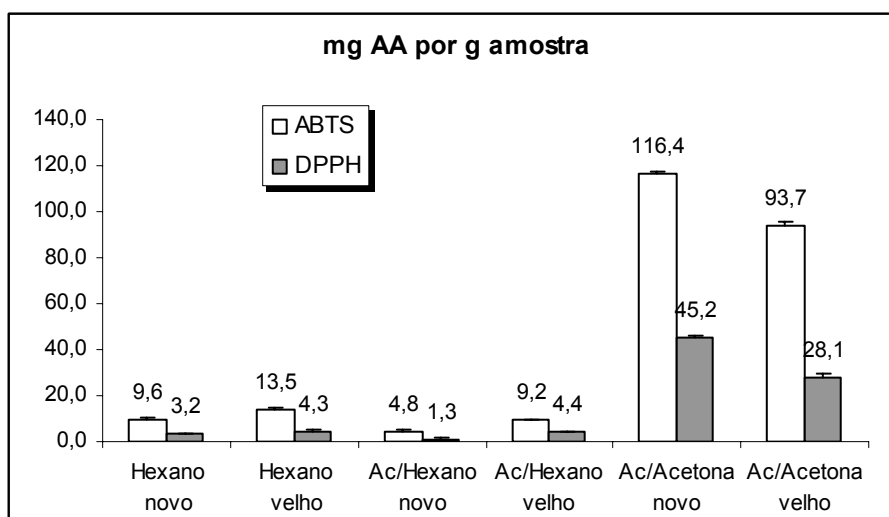


Figura 61 – Actividade antioxidante expressa em quantidade (miligramas) de ácido ascórbico por quantidade (gramas) de extracto.



**Vinho do Porto tinto novo:** vinho do ano 2002 (VPN).

**Vinho do Porto tinto velho:** vinho Tawny 10 anos (VPV).

Da análise dos extractos com maior poder antioxidante para ambos os vinhos (extractos polares) é possível concluir que o vinho do Porto novo tem significativamente maior actividade antioxidante que o vinho do Porto velho [116,4 mg AA/g versus 93,7 mg AA/g para o método do ABTS,  $F_{calc} (0,404) > F_{crítico} (0,053)$  e 45,2 mg AA/g versus 28,1 mg AA/g para o método do DPPH,  $F_{calc} (0,785) > F_{crítico} (0,053)$ ]. Por outro lado, em relação aos extractos apolares, o que apresenta maior poder antioxidante é o extracto de hexano do vinho do Porto velho.

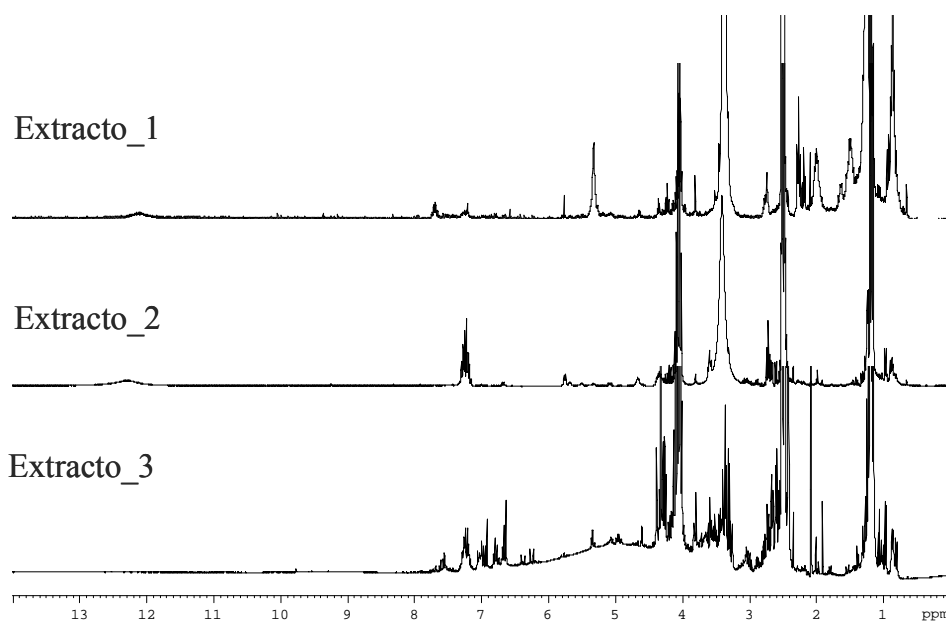


Figura 62 – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  dos extractos de vinho do Porto novo.

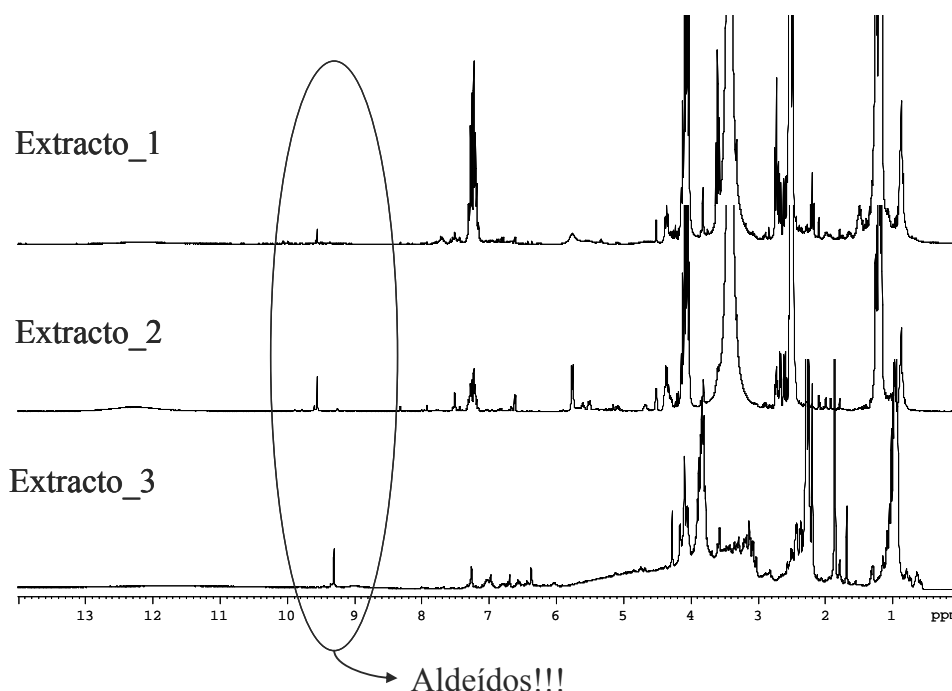


Figura 63 – Espectros de RMN de <sup>1</sup>H dos extractos de vinho do Porto velho.

Os espectros de RMN vinho do Porto velho apresentam aldeídos em todas as fracções orgânicas o que indica que ocorreu oxidação.

A deterioração oxidativa inclui alterações como a rápida perda de aromas frutados e florais e o desenvolvimento de aromas desagradáveis e acastanhamento precoce. Os aldeídos, como é o caso do acetaldeído (etanal), são um subproduto da oxidação dos álcoois. À medida que o vinho vai envelhecendo o etanol dos vinhos transforma-se gradualmente em etanal que tem um aroma pesado, adocicado, e tipo cereja nos vinhos licorosos ou a maçã verde nos vinhos leves.

Além disso, vinhos sujeitos a altas temperaturas e suplementados com oxigénio (níveis de saturação) sofrem uma rápida e pronunciada degradação oxidativa que está relacionada com a presença de aldeídos como o

fenilacetaldeído e o metional [3-(tiometil) propionaldeído] (Silva Ferreira *et al.*, 2002, 2003).

## ***Capítulo 4 – Conclusão e trabalhos futuros***

<i>4.1 – Conclusão</i> .....	114
<i>4.2 – Trabalhos futuros</i> .....	116

#### **4.1 – Conclusão**

Foi desenvolvida uma técnica de fraccionamento do vinho por extracção líquido-líquido. Os extractos foram obtidos por fraccionamento sequencial de vinho branco usando hexano, acetato de etilo e acetona como solventes.

A actividade antioxidante dos extractos extraídos com acetato de etilo e reextraídos com acetona é maior do que a encontrada para os restantes extractos, apresentando valores cerca de 95 % acima dos valores encontrados para os extractos extraídos com hexano.

Apenas cerca de 34 % de compostos com actividade antioxidante são extraídos com o método desenvolvido, fracção orgânica, onde a fracção aquosa representa os restantes 66 % de compostos com actividade antioxidante.

À medida que o vinho branco vai envelhecendo, a actividade antioxidante total dos vinhos diminui. Por outro lado, a fracção orgânica também diminui reflectindo a mesma tendência. Apesar dos poucos vinhos analisados, podemos dizer que a fracção orgânica, apesar de apresentar uma actividade antioxidante inferior à fracção aquosa, parece conter os compostos que são preferencialmente consumidos ao longo do tempo constituindo assim a primeira linha de defesa do

vinho branco à resistência à oxidação e, neste sentido, com interesse no seu estudo.

À excepção dos extractos derivados do tratamento com oxigénio, o tratamento com temperatura parece conduzir a um aumento na capacidade antioxidante dos extractos menos polares. Nos extractos mais polares, tanto o tratamento com oxigénio como o tratamento com temperatura conduzem a uma diminuição da actividade antioxidante dos mesmos.

Quanto maior o oxigénio consumido menor é a actividade antioxidante dos vinhos brancos analisados. O vinho branco sujeito a quatro saturações com oxigénio e submetido à temperatura de 60 °C é o que apresenta menor actividade antioxidante.

Não existe correlação entre o índice de degradação aromática e os métodos de avaliação da capacidade antioxidante que envolvem a captura de radicais (ABTS<sup>•+</sup> e DPPH<sup>•</sup>) utilizados neste trabalho.

Das análises efectuadas é possível concluir que, em comparação com os extractos das fracções obtidas após o fraccionamento, as diferenças encontradas nos efeitos oxigénio e dióxido de enxofre são mais relevantes quando se aplicam os métodos de avaliação de actividade antioxidante ao vinho branco sem fraccionamento.

A zona espectral correspondente à zona dos compostos aromáticos (6 a 8 ppm) é cerca de 10 vezes menor no extracto do vinho branco saturado com oxigénio e mantido à temperatura de 60 °C e cerca de 2 vezes menor no extracto do vinho branco testemunho e mantido à temperatura de 60 °C. O extracto do vinho branco saturado com oxigénio e mantido à temperatura de 20 °C apresenta valores de compostos aromáticos ligeiramente inferiores aos valores encontrados para o extracto do vinho branco testemunho.

O método de fraccionamento de vinho branco desenvolvido neste trabalho não extrai dois dos reconhecidos compostos antioxidantes presentes no vinho, o ácido ascórbico e o dióxido de enxofre. No entanto, outras moléculas com poder antioxidante, menos conhecidas e/ou desconhecidas, e neste sentido com interesse no seu estudo, estão contidas nos extractos orgânicos obtidos após o fraccionamento do vinho branco representando cerca de 35 % do total de compostos com actividade antioxidante. Além disso, estes compostos são preferencialmente consumidos ao longo do tempo constituindo assim a primeira linha de defesa do vinho branco à resistência à oxidação.

As possíveis famílias de compostos existentes nos extractos das fracções orgânicas serão: flavonóides, derivados de ácidos fenólicos, ésteres, na maior parte na forma de acetatos, álcoois com elevados pontos de ebulição, amidas e compostos com grupos tióis.

Por fim, foram propostas algumas estruturas de compostos fenólicos da fracção orgânica extraída bem como da fracção aquosa do vinho branco usado.

O vinho do Porto tinto novo tem significativamente maior actividade antioxidante que o vinho do Porto tinto velho. Além disso, os espectros de vinho do Porto tinto velho apresentam aldeídos em todas as fracções o que indica que ocorreu oxidação dos álcoois existentes neste vinho.

## **4.2 – Trabalhos futuros**

O trabalho futuro passará pela purificação dos extractos obtidos com a técnica desenvolvida neste trabalho de fraccionamento de vinho branco. Esta purificação contemplaria técnicas cromatográficas de GC e HPLC com detecção de massa.

Poderiam ser utilizadas técnicas de derivatização para quantificação de quinonas (produtos da oxidação dos compostos fenólicos) bem como produtos da reacção de Maillard, mencionados neste trabalho como potenciais compostos com actividade antioxidante.

A fracção aquosa do vinho branco também deveria ser estudada por HPLC com detecção de massa.

## *Capítulo 5 – Bibliografia*

Aliaga, C.; Aspee, A.; Scaiano, J. C. A New Method to Study Antioxidant Capability: Hydrogen Transfer from Phenols to a Prefluorescent Nitroxide *Org. Lett.* **2003**, 5 (22), 4145-4148.

Alonso, A. M.; Guillén, D. A.; Barroso, C. G. Development of a new method for determining the antioxidant power of the phenolic compounds present in wines. *Bulletin de L'O. I. V.* **2000**, 73, 837-838, 794-808.

Alzoreky, N.; Nakahara, N. Antioxidant activity of some edible Yemeni plants evaluated by ferrylmyoglobin/ABTS. assays. *Food Sci. Tech. Res.* **2001**, 7, 141–144.

Amakura, Y.; Umino, Y.; Tsuji, S.; Tonogai, Y. Influence of jam processing on the radical scavenging activity and phenolic content in berries. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (12), 6292-6297.

Amarowize, R.; Nacs, M.; Shahidi, F. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 2755-2759.

Anese, M.; Manzocco, L.; Nicoli, M. C.; Lerici, C. R. Antioxidant properties of tomato juices as affected by heating. *J. Sci. Food Agric.* **1999**, 79, 750-754.

Aruoma, O. I. Deoxyribose assay for detecting hydroxyl radicals. *Methods. Enzymol.* **1994**, 233, 57-66.

Augustine, M. P. "Hold The Vinegar" NMR method detects spoilage in unopened wine bottles *Chemical & Engineering News* **2005**, ISSN 0009-2347 (electronic version).

Benavente-Garcia, O.; Castillo, J.; Lorente, J.; Ortuno, A.; Del Rio, J. A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *olea europaea* L leaves. *Food Chem.* **2000**, 68, 457-62.

Bondet, V.; Brand-Williams, W.; Berset, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using DPPH<sup>•</sup> free radical method. *Lebensm. Wissenschaft. Technol.* **1997**, 30, 609-615.

Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wissenschaft. Technol.* **1995**, 28, 25–30.

Braugher, J. M.; Duncan, L. A.; Chase, R. L. The involvement of iron in lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.* **1986**, 261, 10282-10289.

Bressa, F.; Tesson, N.; Dallarosa, M.; Sensidoni, A.; Tubaro, F. Antioxidant effect of maillard reaction products – applications to a butter cookie of a competition kinetics analysis *J. Agric. Food Chem.* **1996**, 44, 692-695.



Burda, S.; Oleszek, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 2774-2779.

Calzada, C.; Bizzotto, M.; Paganda, G.; Miller, N. J.; Bruckdorfer, K. R.; Diplock, A. T.; Rice-Evans, C. A. Levels of antioxidants nutrients in plasma and low-density lipoproteins: a human volunteer supplementation study. *Free Radic. Res.* **1995**, 23, 489-503.

Cano, A.; Hernández-Ruíz, J.; García-Cánovas, F.; Acosta, M.; Arnao, M. B. An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem. Anal.* **1998**, 9, 196-202.

Castillo, J.; Benavente-Garcia, O.; Lorente, J.; Alcaraz, M.; Redondo, A.; Ortuno, A.; Del Rio, J. A. Antioxidant activity and radioprotective effects against chromosomal damage induced in vivo by X-rays of flavan-3-ols (Procyanidins) from grape seeds (*Vitis vinifera*): comparative study versus other phenolic and organic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 1738-1745.

Chatterjee, S.; Niaz, Z.; Gautam, S.; Adhikari, S.; Variyar, P.; Sharma, A. Antioxidant activity of some phenolic constituents from green pepper (*Piper nigrum* L.) and fresh nutmeg mace (*Myristica fragrans*) *Food Chem.* **2007**, 101, 515-523.  
Chen, J. H.; Ho, C. T. Antioxidant activities of caffeic acid and its hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 3036-3043.

Chen, Y.; Wang, M.; Rosen, R. T.; Ho, C. T. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from *Polygonum multiflorum* thunb. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 2226-2228.

Chevalier, F.; Chobert, J. M.; Genot, C.; Haertlé, T. Scavenging of free radicals, antimicrobial, and cytotoxic activities of the maillard reaction products of b-lactoglobulin glycosylated with several sugars. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (10), 5031-5038.

Choi, H. S.; Song, H. S.; Ukeda, H.; Sawamura, M. Radical-scavenging activities of citrus essential oils and their components: Detection using 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48(9), 4156-4161.

Cotelle, N.; Bernier, J. L.; Catteau, J. P.; Pommery, J.; Wallet, J. C.; Raydou, E. M. Antioxidant properties of hidroxy-flavones. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**, 20, 35-43.

Cross, J. L.; Gallaher, T. N.; Leary, J. J.; Schreiner, S. The Application of Site-Specific Natural Isotope Fractionation- Nuclear Magnetic Resonance (SNIF-NMR) to the Analysis of Alcoholic Beverages. *The Chemical Educator* **1998**, (3) Issue 5: 1430-4171 (electronic version).

Da Porto, C.; Calligaris, S.; Celotti, E.; Nicoli, M. C. Antiradical properties of commercial cognacs assessed by the DPPH test. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (9), 4241-4245.

De Ancos, B.; González, E. M.; Cano, M. P. Ellagic acid, vitamin c, and total phenolic contents and radical scavenging capacity affected by freezing and frozen storage in raspberry Fruit. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (10), 4565-4570.

Degenhardt A, Engelhardt UH, Wendt AS, Winterhalter P. Isolation of black tea pigments using high-speed countercurrent chromatography and studies on properties of black tea polymers. *J Agric Food Chem.* **2000**, 48 (11), 5200-5205.

Delgado-Vargas, F.; Jiménez, A. R.; Paredes-López, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains- characteristics, biosynthesis, processing, and storage. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2000**, 40, (3), 173-289.

Du Toit, R.; Volsteadt, Y.; Apostolides, Z. Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and teas measured as vitamin C equivalents. *Toxicology* **2001**, 166, 63-69.

Eiserich, J. P.; Macku, C.; Shibamoto, T. Volatile antioxidants formed from an L-cysteine D-Glucose maillard model system. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 1982-1988.

Eiserich, J. P.; Shibamoto, T. Antioxidant activity of volatile heterocyclic compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 1060-1063.

Eiserich, J. P.; Wong, J. W.; Shibamoto, T. Antioxidant activities of furan and thiophenethiols measured in lipid peroxidation systems and by tyrosyl radical scavenging assay. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 647-650.

Espín, J. C. Soler-Rivas, C.; Wichers, H. J.; García-Viguera, C. Anthocyanin-based natural Colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff *J. Agric. Food Chem.* **2000b**, 48 (5), 1588-1592.

Espín, J. C.; Soler-Rivas, C.; Wichers, Harry J. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl radical *J. Agric. Food Chem.* **2000a**, 48 (3), 648-656.

Etievant. Ch. 14 Wine, in: "Volatile compounds in food and beverages", edited by Maarse H, Maral Dekker, **1991**, Inc. New York, 483-546.

Fogliano, V.; Verde, V.; Randazzo, G.; Ritieni, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J Agric Food Chem.* **1999**, 47, 1035-1040.

Foti, M.C.; Daquino, C.; Geraci, C. Electron-Transfer Reaction of Cinnamic Acids and Their Methyl Esters with the DPPH Radical in Alcoholic Solutions. *J. Org. Chem.* **2004**, 69 (7) 2309-2314.

Franzke, C.; Ivanisky, H. Antioxidant capacity of melanoidin. *Dtsch. Lebensm. Rundsch* **1954**, 50, 251-254.

Fukumoto, L. R.; Mazza, G. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (8), 3597-3604.

Fuster, M. D; Mitchell, A. E.; Ochi, H.; Shibamoto, T. Antioxidant activities of heterocyclic compounds formed in brewed coffee. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 5600-5603.

Genser, D.; Kang, M. H.; Vogelsang, H.; Elmadfa, I. Status of liposoluble antioxidants and TRAP in patients with Crohn's disease and healthy controls. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1999**, 53, 675-679.

Gil, M I.; Tomás-Barberán, F. A.; Hess-Pierce, B.; Holcroft, D. M.; Kader, A. A. Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (10), 4581-4589.

Gordon, M. H.; Paiva-Martins, F.; Almeida, M. Antioxidant activity of hydroxytyrosol acetate compared with that of other olive oil polyphenols. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (5), 2480-2485.

Guedes de Pinho P.; Ferreira, A. C.; Mendes Pinto, M.; Gomez Benitez, J. and Hogg, T. Determination of carotenoid profiles in grapes, musts and fortified wines from Douro varieties of *Vitis vinifera*. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (11), 5484-5488.

Halliwell, B.; Gutteridge, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radical, transition metals and disease. *Biochem. J.* **1984**, 219, 1-14.

Harborne, J. B. (Ed.) The Flavonoids: Advances in Research Since 1986, **1993**, Chapman and Hall, London, UK.

Hargeman, A. E.; Riedl, K. M.; Jones, G. A.; Sovik, K. N.; Ritchard, N. T.; Hartzfeld, P. W.; Riechel, T. L. High molecular weight plant polyphenolic (tannis) as biological antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 1887-1892.

Hayase, F.; Takahashi, Y.; Tomonaga, S.; Miura, M.; Gomyo, T.; Kato, H. Identification of blue pigments formed in a D-xylose-glycine reaction system. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **1999**, 63, 1512-1514.

Hong, N.; Yaylayan, V. A.; Raghavan, G. S.; Pare, J. R.; Belanger, J. M. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from grape seed. *Nat. Prod. Lett.* **2001**, 15 (3), 197-204.

Hou, W. C.; Lee, M. H.; Chen, H. J.; Liang, W. L.; Han, C. H.; Liu, Y. W.; Lin, Y. H. Antioxidant activities of dioscorin, the storage protein of yam (*Dioscorea batatas* Decne) tuber. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (10), 4956-4960.

[http://goldbook.iupac.org/src\\_PAC1994661077.html](http://goldbook.iupac.org/src_PAC1994661077.html)

Ide, N.; Lau, B. H. S.; Ryu, K.; Matsuura, H.; Itakura, Y. Antioxidant effects of fructosyl arginine, a maillard reaction product in aged garlic extract. *J. Nutr. Biochem.* **1999**, 10, 372-376.

Jiménez, J.; Navarro, M. C.; Montilla, M. P.; Martín, A.; Martínez, A. J. Thymus Zygis oil: its effects on CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity and free scavenging activity. *J. Essent. Oil Res.* **1993**, 5, 153-158.

Jing, H.; Kitts, D. D. Comparison of the antioxidative and cytotoxic properties of glucose-lysine and fructose-lysine maillard reaction products. *Food Res. Int.* **2000**, 33, 509-516.

Keller, R. J.; Halmes, N. C.; Hinson, J. A.; Pumford, N. R. Immunochemical detection of oxidized proteins. *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, 4, 430-433.

Kilmartin, P. A., Zou, H. and Waterhouse, A. L., A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidants of wine and wine phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 49, 1957-1965.

Kim, D. K. Antioxidative components from aerial parts of *Lactuca scariola* L. *Archives of Pharm. Res.* **2001**, 24, 427-430.

Kroh, L.W. Caramelization in food and beverages. *Food Chem.* **1994**, 51, 373–379.

Kubo, I.; Kinst-Hori, I.; Kubo, Y.; Yamagiwa, Y.; Kamikawa, T.; Haraguchi, H. Molecular Design of Antibrowning Agents. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48 (4), 1393-1399.

Larrauri, J. A.; Sánchez-Moreno, C.; Rupérez, P.; Saura-Calixto, F. Free radical scavenging capacity in the aging of selected red spanish wines. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47 (4), 1603-1606.

Lebeau, J.; Furman, C.; Bernier, J. L.; Duriez, P.; Teisser, E.; Cotelle, N. Antioxidant properties of di-tert-butylhydroxylated flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.* **2000**, 29, 900-912.

Leonardi, C.; Ambrosino, P.; Esposito, F.; Fogliano, V. Antioxidative activity and carotenoid and tomatine contents in different typologies of fresh consumption tomatoes. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 4723-4727.

Leong, L.; Shui, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chem.* **2002**, 76, 69-75.

Liebert, M.; Licht, U.; Böhm, V.; Bitsch, R. Antioxidant properties and total phenolics content of green and black tea under different brewing conditions. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **1999**, 208, 217-220.

Lin, J. S.; Smith, V.; Olcott, H. S. Loss of free-radical signal during induction period of unsaturated lipids containing nitroxide antioxidants. *J. Agric. Food Chem.* **1974**, 22, 682-684.

Loubser G. I.; Du Plessis, C. S. The quantitative determination of some values of dimethyl sulphide in white table wines. *Vitis* **1976**, 15, 248-252.

Lu, Y.; Foo, L. Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. *Food Chem.* **2000**, 68, 81-85.

Macku, C.; Shibamoto, T. Volatile antioxidants produced from heated corn oil glycine model system. *J. Agric. Food Chem.* **1991**, 39, 1990-1993.

Madsen, H. L.; Andersen, C. M.; Jorgensen, L. V.; Skibsted, L. H. Radical scavenging by dietary flavonoids. A Kinetic study of antioxidant efficiencies. *Eur. Food Res. Tech.* **2000**, 211, 240-246.

Maldonado, P. D.; Rivero Cruz, I.; Mata, R.; Pedraza Chaverri, J. Antioxidant activity of a-type proanthocyanidins from *Geranium niveum* (Geraniaceae). *J. Agric Food Chem.* **2005**, 23: 53 (6) 1996-2001.

Mannino, S.; Brenna, O.; Buratti, S.; Cosio, M. S. A new method for the evaluation of the "antioxidant power" of wines. *Electroanalysis* **1998**, 10, N° 13, 908-912.

Mason, R. P. Using anti-5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (anti-DMPO) to detect protein radicals in time and space with immuno-spin trapping\*1 *Free Radic. Biol. Med.* **2004**, 36, 1214-1223.

Mastrocola, D.; Munari, M.; Cioroi, M.; Lerici, C. R. Interaction between maillard reaction products and lipid oxidation in starch-based model systems. *J. Sci. Food Agric.* **2000**, 80, 684-690.

Miki, W. Biological functions and activities of animal carotenoids. *Pure Appl. Chem.* **1991**, 63, (1), 141-146.

Miller, H. E.; Rigelhof, F.; Marquart, L.; Prakash, A.; Kanter, M. Whole-grain products and anti-oxidants. *Cereal Foods* **2000**, 45, 59-63.

Miller, N. J.; Rice-Evans, C.; Davies, M. J.; Gopinathan, V.; Milner, A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical Science* **1993**, 84, 407-412.

Miller, N. J.; Sampson, J.; Candeias, L. P.; Bramley, P. M.; Rice-Evans, C. A. Antioxidant activities of carotenes and xanthophylls. *FEBS Letters* **1996**, 384, 240-242.

Minamiyama, J.; Andoshikawa, T.; tanigawa, T.; Takahashi, S.; Naito, Y.; Ichikawa, H.; Kondo, M. Antioxidative effects of a processed grain food. *J. Nut. Sci. Vitaminol.* (Tokyo). **1994**, 40, 467-477.

Molyneux, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hidrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* **2004**, 26 (2), 211-219.

Monteiro, F. F.; Trousdale, E. K.; Bisson, L. F. Ethyl carbamate formation in wine: use of radioactivity labelled precursors to demonstrate the involvement of urea. *Am. J. Enol. Vític.* **1989**, 40, 1-8.

Morales, F. J.; Jimenez-Perez, S. Free radical scavenging capacity of maillard reaction products as related to colour and fluorescence. *Food Chem.* **2001**, 72, 119-125.

Morales, F. J.; Van Boekel, M. A study on advanced maillard reaction in heated casein/sugar solutions: colour formation. *Int. Dairy J.* **1998**, 8, 907-915.



Musialik, M.; Litwinienko, G. Scavenging of dpph\* radicals by vitamin E is accelerated by its partial ionization: the role of sequential proton loss electron transfer. *Org Lett.* **2005**, 7 (22) 4951-4.

Nakanishi, I.; Kawashima, T.; Ohkubo, K.; Kanazawa, H; Inami, K.; Mochizuki.; Fukuhara, K.; Okuda, H.; Ozawa, T.; Itoh, S.; Fukuzumi, S.; Ikota, N. Electron-transfer mechanism in radical-scavenging reactions by a vitamin E model in a protic medium. *Org Biomol Chem.* **2005**, 21; 3 (4) 626-629.

Nanjo, F.; Goto, K.; Seto, R.; Suzuki, M.; Sakai, M.; Hara, Y. Scavenging effects of tea catechin and their derivatives on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Rad. Biol. Med.* **1996**, 21, 895-902.

Neil V. Blough, Daniel J. Simpson Chemically mediated fluorescence yield switching in nitroxide-fluorophore adducts: optical sensors of radical/redox reactions *J. Am. Chem. Soc.* **1988**, 110 (6) 1915-1917.

Nicoli, M. C.; Anese, M.; Parpinel, M. T.; Franceschi, S.; Leirici, C. R. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. *Cancer Lett.* **1997**, 114, 71-74.

Niki, E. Radical initiators as source of water- or lipid-soluble peroxy radicals. *Methods. Enzymol.* **1990**, 186, 100-108.

Nikolaos Nenadis, Lan-Fen Wang, Maria Tsimidou,\* and Hong-Yu Zhang\* Estimation of Scavenging Activity of Phenolic Compounds Using the ABTS+ Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, 52 (15) 4669 -4674.

Noguchi, N.; Komuro, E.; Niki, E.; Willson, R. L. Action of curcumin as an antioxidant against lipid peroxidation. *J. Jpn. Oil Chem.* **1994**, 43, 1045-1051.

Nomura, T.; Kikuchi, M.; Kubodera, A.; Kawakami, Y. Proton-donative antioxidant activity of fucoxanthine with 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH). *Biol. Mol. Biol. Int.* **1997**, 42, 361-370.

Oliveira, C. M.; Silva Ferreira, A. C.; Guedes de Pinho, P.; Hogg, T. Development of a potentiometric method to measure the resistance to oxidation of white wines and the antioxidant power of their constituents. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 2121-2124.

Oliveira, C.; Silva Ferreira, A. C.; Hogg, T.; Alves, F.; Mendes Minto M.; Guedes de Pinho, P. Carotenoid compounds in grapes and their relationship to plant water status. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51 (20), 5967-5971.

Ough, C. S. and Amerine, M. A. *Methods For Analysis of Musts and Wines* **1988**, Second Edition. John Wiley & Sons, New York.

Palma 1996, patente nº P9601884.

Palma, M and Barroso, C. Application of a new analytical method to determine the susceptibility of wine to browning. *Eur. Food Res. Technol.* **2002**, 214, 441-443.

Palma, M.; Zulema, P.; Carmelo, G. B. Stability of phenolic compounds during extraction with superheated solvents. *J. Chromatogr. A* **2001**, 921, 169–174.

Pekkarinen, S. S.; Schwarz, K.; Heinonen, I. M.; Hopia, A. I. Antioxidant activity and partitioning of phenolic acids in bulk and emulsified methyl linoleate. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 3036-3043.

Pietta, P.; Simonetti, P.; Mauri, P. Antioxidant activity of selected medicinal plants. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 456, 4487-4490.

Pineiro, Z.; Palma, M.; Barroso, C. G. Determination of catechins by means of extraction with pressurized liquids. *J. Chromatogr. A* **2004**, 13; 1026 (1-2), 19-23.

Rapisarda, P.; Tomaino, A.; Lo Cascio R.; Bonina, F.; De Pasquale A.; Saija, A. Antioxidant effectiveness as influenced by phenolic content of fresh orange juice. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 4718-4723.

Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad. Biol. Med.* **1999**, 26, 1231-1237.

Ribéreau-Gayon, J.; Peynaud, E.; Ribéreau-Gayon, P.; Sudraud, P. (1972) *Traité d'Œnologie*. Tome 1: Analyse et Contrôle des Vins. Paris: Dunod.

Ribéreau-Gayon, P. *Les Composés Phénoliques du Raisin et du Vin*. Institut Nationale de la Recherche Agronomique, **1964**, Paris.

Ribereau-Gayon, P.; Glories, Y.; Maugean, A.; Dubourdieu, D. (Ed.) *Handbook of Enology Volume 2: The Chemistry of Wine Stabilization and Treatments* **2000**, John Wiley & Sons, New York.

Rice-Evans, C.; Miller, N. J. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS<sup>•+</sup> radical cation assay. *Free Rad. Res.* **1997**, 26, 195-199.

Rice-Evans, C.; Miller, N. J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. *Methods. Enzymol.* **1994**, 234, 279-293.

Rice-Evans, C.; Miller, N. J.; Bolwell, P. G.; Bramley, P. M.; Pridham, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad. Res.* **1995**, 22, 375-383.

Rivero-Pérez, M. D.; Pérez-Magarino, S.; González-San José, M. L. Role of melanoidins in sweet wines. *Anal. Chim. Acta* **2002**, 169-175.

Sabio, E.; Lozano, M.; Montero de Espinosa, V.; Mendes, R. L.; Pereira, A. P.; Palavra, A. F.; Coelho, J. A. Lycopene and Carotene Extraction from Tomato Processing Waste Using Supercritical CO<sub>2</sub>. *Ind. Eng. Chem. Res.* **2003**, 42 (25), 6641 -6646.

Saint-Cricq, de Gaulejac, N.; Glories, Y.; Vivas, N. Free radical scavenging effect of anthocyanins in red wines. *Food Res. Int.* **1999**, 32, 327-333.

Sánchez-Moreno, C. Methods used to evaluate the free radical sacavening activity in foods and biological systems. *Food Sci. Tech. Int.* **2002**, 8 (3), 121-137.

Sánchez-Moreno, C.; Larrauri, J. A. Main methods used in lipid oxidation determination. *Food Sci. Technol. Internat.* **1998**, 4, 391-399.

Sawai, Y.; Sakata, K. NMR analytical approach to clarify the antioxidative molecular mechanism of catechins using 1,1-diphenylpicrylhydrazyl *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46, 111-114.

Scheller, S.; Wilczok, T.; Imielski, S.; Krol, W.; Gabrys, J.; Shani, J. Free radical scavenging by ethanol extract of propolis. *Int. J. Radiat. Biol.* **1990**, 57(3), 461-465.

Shaker, E. S.; Ghazy, M. A.; Shibamoto, T. Antioxidant activity of volatile browning reaction products and related compounds in a hexanal/hexanoic acid system. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 1017-1022.

Shimada, K.; Fujikawa, K.; Yahara, K.; Nakamura, T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in ciclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, 40, 945-948.

Silva Ferreira, A C.; Guedes de Pinho, P.; Rodrigues, P.; Hogg, T. Kinetics of oxidative degradation of white wines and how they are effected by selected technological parameters . *J. of Agric. Food Chem.* **2002**, 50(21) 5919-5924.

Silva Ferreira, A C.; Hogg, T.; Guedes de Pinho, P. Identification of key-odorants related to the typical aroma of oxidation-spoiled white wines. *J. of Agric. Food Chem.* **2003**, 51 (5), 1377-1381.

Silva Ferreira, A. C. Caractérisation du vieillissement du vin de Porto approche chimique et statistique rôle aromatique du sotolon. Thèse de Doctorant de L'Université de Bordeaux. N° 593, **1998**.

Silva, F. A. M.;Borges, F.; Guimarães, C.; Lima, J. L. F. C.; Matos, C.; Reis, S. Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity and physicochemical parameters *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 8 (6), 2122-2126.

Simonetti, P.; Pietta, P.; Testolin, G. Polyphenol content and total antioxidant potencial of selected italian wines. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 1152-1155.

Singleton, V. L. A survey of wine aging reactions, especially with oxygen. *In Proceedings of the ASEV 50<sup>th</sup> Anniversary Annual Meeting*. American Society for Enology and Viticulture, **2000**, Davis, California.

Singleton, V. L. Oxygen with phenols and related reactions in musts, wines, and model systems: Observations and practical implications. *Am. J. Enol. Vitic.* **1987**, 38, 69-77.

Sonnen, A. F.-P.; Bakirci, H.; Netscher, T.; Nau, W. M. Effect of Temperature, Cholesterol Content, and Antioxidant Structure on the Mobility of Vitamin E Constituents in Biomembrane Models Studied by Laterally Diffusion-Controlled Fluorescence Quenching *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127 (44) 15575-15584.

Stahl, W.; Sies, H. Antioxidant defense: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes* **1997**, 46(2), 14-18.

Suh, H. J.; Lee, J. M.; Cho, J. S.; Kim, Y. S.; Chung, S. H.; Radical scavenging compounds in onion skin. *Food Res. Internat.* **1999**, 32, 659-664.

Sun, L.; Rezaei, K. A.; Temelli, F.; Ooraikul, B. Supercritical fluid extraction of alkylamides from *Echinacea angustifolia*. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50(14), 3947-3953.

Sung, H.; nah, J.; Park, H.; Yang, S. E.; Min, W. K. In vivo antioxidant effect on green tea. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2000**, 54, 527-529.

Szwajgier, D.; Pielecki, J.; Targonski, Z.;. Changes Comparison in vivo antioxidant activities of malt hops, worts and lager beer. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* **2000**, 9 (50), 53-59.

Tadolini, B.; Juliano, C.; Piu, L.; Franconi, F.; Cabrini, L. Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. *Free Rad. Res.* **2000**, 33, 105-114.

Tang, Yanli; He, Fang; Yu, Minghui; Wang, Shu; Li, Yuliang; Zhu, Daoben Radical Scavenging Mediating Reversible Fluorescence Quenching of an Anionic Conjugated Polymer: Highly Sensitive Probe for Antioxidants *Chem. Mater.* **2006**, 18 (16) 3605-3610.

Tressi, R.; Wondrak, G. T.; Krüger, R. P.; Rewicki, D. New melanoidin-like maillard polymers from 2-deoxypentoses. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46 (1), 104-110.

Von Gadow, A.; Joubert, E.; Hansmann C. F. Comparison of the antioxidant activity of aspalathin with other plant phenols of rooibos tea (*Aspalathus linearis*),  $\alpha$ -tocopherol, BHT, and BHA. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, 45, 632-638.

Wang, M.; Jin, Y.; Ho, C. T. Evaluation of resveratrol derivatives as potential antioxidants and identification of a reaction product of resveratrol and 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, 47, 3974-3977

Weekley, A J.; Bruins, P.; Augustine, M. P. Nondestructive Method of Determining Acetic Acid Spoilage in an Unopened Bottle of Wine. *Am. J. Enol. Vitic.* **2002**, 53 (4), 318-321.

Weekley, A J.; Bruins, P.; Sisto, M.; Augustine, M. P. Using NRM to study full intact wine bottles. *J. Mag. Resson.* **2003**, 161, 91-98.

[www.eurofins.com](http://www.eurofins.com)

[www.ivv.min-agricultura.pt](http://www.ivv.min-agricultura.pt)

Yamaguchi, F.; Ariga, T.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H. Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J. Agric. Food Chem.* **2000a**, 48(2), 180-185.

Yamaguchi, F.; Saito, M.; Ariga, T.; Yoshimura, Y.; Nakazawa, H. Free radical scavenging activity and antiulcer activity of garcinol from *Garcinia indica* fruit rind. *J. Agric. Food Chem.* **2000b**, 48(6), 2320-2325.

Yen, G. C.; Hsieh C. L. Antioxidant activity of extracts from Du-zhong (*Eucommia ulmoides*) toward various lipid peroxidation models in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, 46 (10), 3952-3957.

Yen, G. C.; Hsieh, C. L. Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43 (1), 27-32.

Yokozawa, T.; Chen, C. P.; Dong, E.; Tanaka, T.; Nonaka, G. I.; Nishioka, I. Study on the inhibitory effect of tannins and flavonoids against the 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, 56, 213-222.

Yoshida, T.; Mori, K.; Hatano, T.; Okumura, T.; Uehara, I.; Komagoe, K.; Fujita, Y.; Okuda, T. Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. V. Radical-scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-diphenyl-2-picryl-hidrazyl radical. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 1919-1921.

Young, J. F.; Nielsen, S. E.; Haraldsdottir, J. Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am. J. Clin. Nutr.* **1999**, 69, 87-94.

Yu, L. Free radical scavenging properties of conjugated linolenic acids. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49, 3452-3456.

Zafrilla, P.; Ferreres, F.; Tomás-Barberán, F. A. Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) Jams. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, 49 (8), 3651-3655.

Zielinski, H.; Kozłowska, H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, 48, 2008-2016.

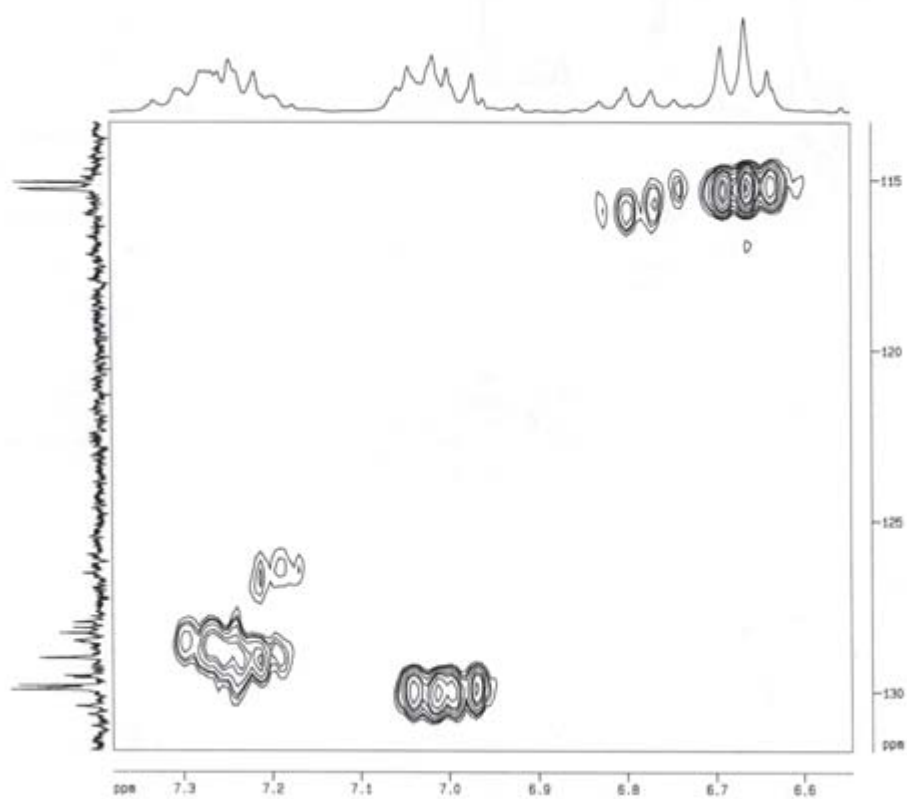


## Capítulo 6 – Anexos

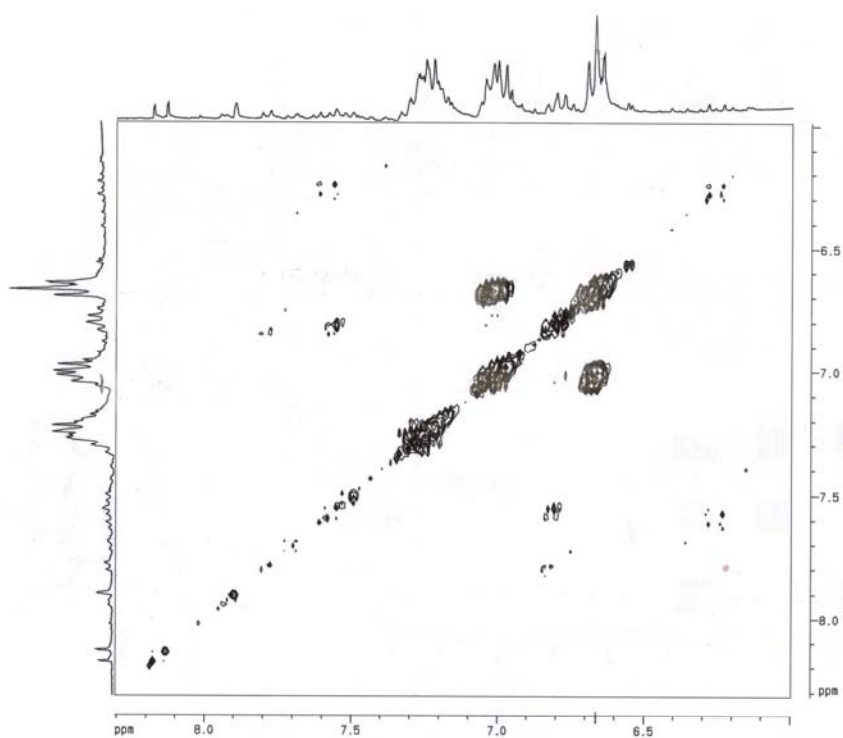
6.1 - HSQC – <i>Fracção orgânica do vinho branco testemunho – ampliação da zona aromática</i> .....	136
6.2 - COSY – <i>Fracção orgânica do vinho branco testemunho – ampliação da zona aromática</i> .....	137
6.3 - HMBC – <i>Fracção orgânica do vinho branco testemunho (ampliação)</i> .....	138
6.4 - HSQC – <i>Fracção aquosa do vinho branco testemunho – ampliação da zona aromática</i> .....	139
6.5 - COSY – <i>Fracção aquosa do vinho branco testemunho – ampliação da zona aromática</i> .....	140

6.6 - HMBC – <i>Fracção aquosa do vinho branco testemunho</i> .....	141
---	-----

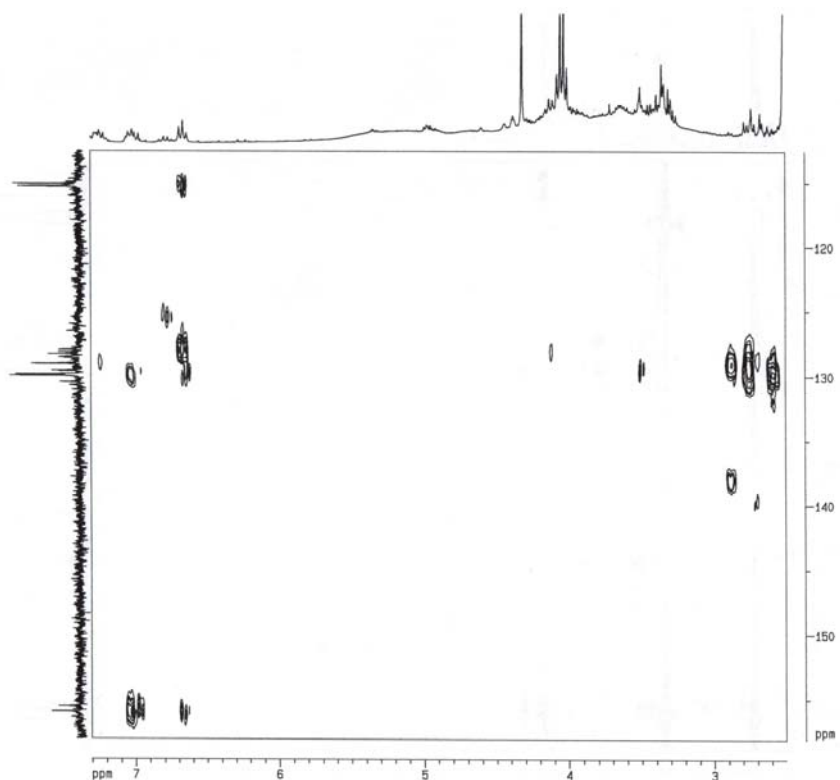
**6.1 - HSQC – Fracção orgânica do vinho branco testemunho –  
ampliação da zona aromática**



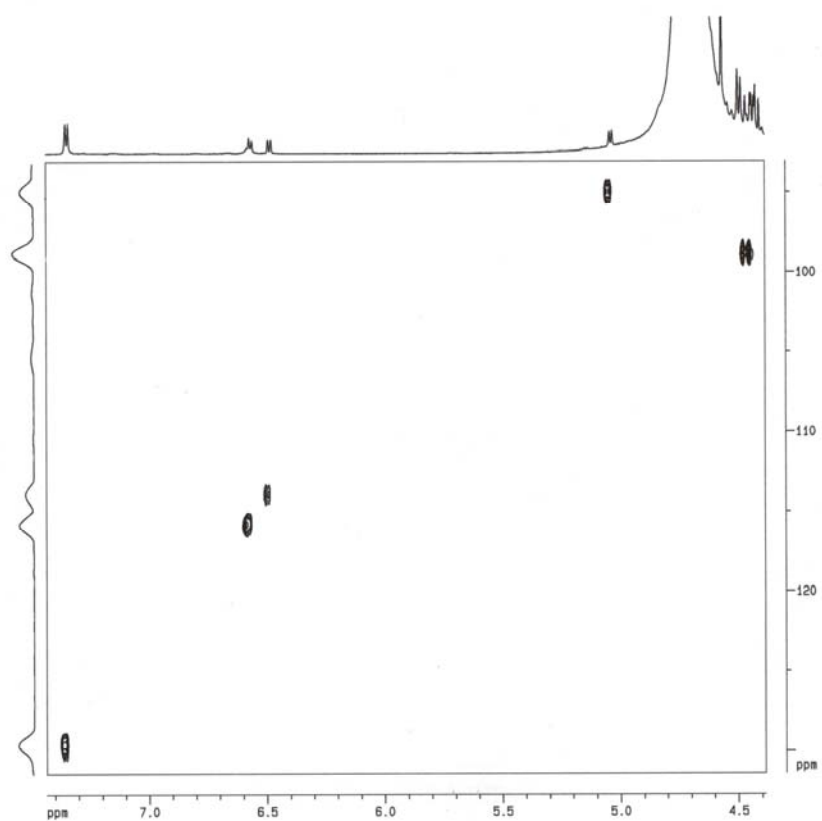
## 6.2 - COSY – Fracção orgânica do vinho branco testemunho – ampliação da zona aromática



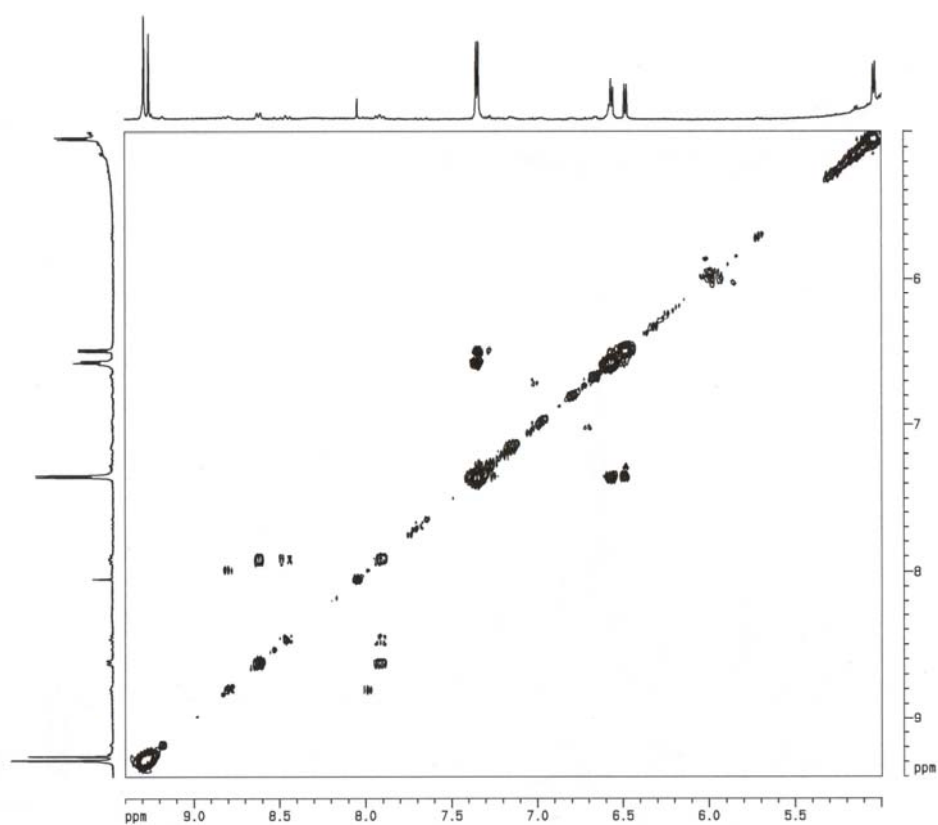
### 6.3 - HMBC – Fracção orgânica do vinho branco testemunho (ampliação)



#### 6.4 - HSQC – Fracção aquosa do vinho branco testemunho – ampliação da zona aromática



**6.5 - COSY – Fracção aquosa do vinho branco testemunho –  
ampliação da zona aromática**



## 6.6 - HMBC – Fracção aquosa do vinho branco testemunho

